

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Prevalencia de mutaciones en los genes PFDHFR y
PFDHPS de Plasmodium falciparum en muestras de
pacientes con malaria severa y/o complicada, del banco
de muestras biológicas del NAMRU-6**

TESIS

**Para obtener la licenciatura en Tecnología Médica en Laboratorio
Clínico y Anatomía Patológica**

AUTOR

Meddly Leslye Santolalla Robles

ASESOR

William Cornejo Medina

Lima – Perú

2015

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente

Lic. T.M. Miguel Sandoval Vegas.

Miembros

Lic. T.M. Giuliana Romero Barrenechea

Lic. T.M. William Henry Roldan González

ASESOR

Dr. William Renee Cornejo Medina

Profesor Asociado e Investigador permanente
Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión”
Facultad de Medicina - U.N.M.S.M.

CO-ASESORES

Mg. Carola J. Salas Hermoza

Departamento de Parasitología, Centro de Investigación de Enfermedades
Tropicales de la Marina de los Estados Unidos-Lima Perú (NAMRU-6)

Dr. Salomón Durand, MD, MSc

Departamento de Parasitología, Centro de Investigación de Enfermedades
Tropicales de la Marina de los Estados Unidos-Iquitos Perú (NAMRU-6)

Dr. David J. Bacon, PhD

Departamento de Parasitología, Centro de Investigación de Enfermedades
Tropicales de la Marina de los Estados Unidos-Lima Perú (NAMRU-6)

Dedicatoria

Con especial cariño a mi mamá Mimba, mi tía Raquel, mi abuelito Nicolás y mi abuelita Albina, por su confianza depositada en mí y por todo el amor que me dieron.

Agradecimientos

A Dios por haberme guiado, haber fortalecido mi corazón e iluminado mis planes y sueños, así como por haber permitido que conozca a aquellas personas que han sido de gran ayuda y de compañía durante toda esta etapa de estudio. A mis abuelitos Albina y Nicolás quienes con amor y ejemplo me dieron fuerzas para mantenerme firme en mi camino. A mi madre Mimba Robles por su inmensurable amor y dedicación. A mis tíos y tías que me dieron su apoyo y compañía en todo momento. A mis primos y hermanos por sus palabras de cariño y aprecio, Kris, Jimmy y Ronald. A mi asesor William cornejo por sus dedicación y paciencia. A mi supervisora de trabajo Carmen Lucas, a quien le agradezco toda la ayuda, consejos y guía brindada. A mi co-asesora Carola Salas por enseñarme todos los procedimientos de laboratorio y también por sus correcciones durante la elaboración del proyecto y manuscrito de tesis. Al Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos, NAMRU-6 por el financiamiento otorgado a través de DoD/GEIS y en especial al Dr. David Bacon del Departamento de Parasitología quien me abrió las puertas del laboratorio. Y finalmente a mis colegas del trabajo Stella Chenet, Pablo Tsukayama y Jorge Nuñez a quienes les estoy agradecida por su amistad y guía profesional.

CONTENIDO

Introducción.....	1
Epidemiología de la malaria	1
Malaria Severa y/o Complicada.....	3
Farmacoresistencia.....	7
Bases moleculares de resistencia a SP	10
Metodología.....	12
Objetivos e hipótesis	12
Línea de investigación y diseño de estudio.....	12
Operacionalización de variables	14
Consideraciones éticas del estudio de tesis.....	17
Plan de análisis de datos	17
Materiales y métodos.....	19
Materiales.....	19
Material biológico	19
Material no biológico	20
Procedimientos.....	23
Características clínico-demográficas	23
Caracterización molecular.....	23
Resultados	33
Características clínico-demográficas de los pacientes	33
Caracterización molecular	33
Discusión.....	36
Conclusiones y recomendaciones	46
Bibliografía.....	47
Tablas y figuras.....	58
Anexos.....	75

ABREVIATURAS

SP	Tratamiento antimalárico combinado Sulfadoxina- Pirimetamina
MQ	Antimalárico mefloquina
AS	Antimalárico artesunato
CQ	Antimalárico cloroquina
Clin	Clindamicina
MQ-AS	Tratamiento antimalárico combinado mefloquina- artesunato
OGE	Oficina General de Epidemiología
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
MINSa	Ministerio de Salud
NAMRU-6	Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los EEUU, por sus siglas en inglés de Navy Medical Research Unit-6
DHFR	Enzima dihidrofolato reductasa
DHPS	Enzima dihidropteroato sintasa
<i>Pfdhfr</i>	Gen codificante de la enzima dihidrofolato reductasa de <i>P. falciparum</i>
<i>Pfdhps</i>	Gen codificante de la enzima dihidropteroato sintasa de <i>P. falciparum</i>
Par/ μ L	Parásitos por μ L de volumen de sangre, observados en la gota gruesa.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés de Polymerase chain reaction
RFLP	Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción, por sus siglas en inglés <u>Restriction Fragment Length Polymorphism</u>

RESUMEN

Introducción: Malaria representa una emergencia médica debido a la posible complicación y muerte del paciente cuando este no fue tratado apropiadamente. Malaria severa y/o complicada (MSC) es causada casi exclusivamente por *Plasmodium falciparum*. Uno de los factores de riesgo asociado con MSC es el tratamiento inadecuado de los casos de malaria no complicada (MNC). **Objetivos:** Se genotipificó a los genes dihidrofolato reductasa (*Pf dhfr*) y dihidropteroato sintasa (*Pf dhps*) en muestras de 60 pacientes con MSC. La resistencia al tratamiento combinado sulfadoxina-pirimetamina (SP) es causado principalmente por mutaciones puntuales en esos genes **Diseño de estudio:** Los pacientes con MSC de este estudio fueron enrolados durante el brote de malaria de 1998, cuando SP era la primera línea de tratamiento. **Materiales y métodos:** Se usó el método de secuenciamiento de Sanger para la identificación de los polimorfismos en el gen *Pf dhfr* y los métodos PCR-RFLP y PCR alelo-específico para el gen *Pf dhps*. **Resultados:** Se encontró que el 84% de las muestras tenían el genotipo del parásito cuádruple mutante N51I/S108N/I164L/inserción repetición Bolivia, y el 16% restante el genotipo mutante simple S108N. Con respecto al gen *Pf dhps*, encontramos cuatro genotipos, siendo el triple mutante A437G/K540E/A581G el más frecuente (78%). **Conclusiones:** Observamos que las mutaciones I164L de *Pf dhfr* y K540E de *Pf dhps* en los casos de MSC fueron más del doble de frecuente comparado con los reportes publicados en casos de MNC en la misma área y periodo de estudio.

ABSTRACT

Introduction: Malaria represents a medical emergency because it may rapidly progress to complication and death without prompt and appropriate treatment. Severe and/or complicated malaria (SCM) is almost exclusively caused by *Plasmodium falciparum*. One of the risk factors associated with SCM is an inappropriate treatment of the non-complicated malaria (NCM). **Objectives:** We genotyped the dihydrofolate reductase (*Pf dhfr*) and dihydropteroate synthase (*Pf dhps*) genes from 60 SCM patients. Resistance to SP in *P. falciparum* is caused mainly by specific mutations at those genes. **Study design:** SCM patients of this study were enrolled during the malaria outbreak in 1998, when sulfadoxine/pyrimethamine (SP) was the first line of treatment. **Material and methods:** We used a Sanger sequencing approach for the identification of polymorphisms at *Pf dhfr* gene codons, and in the case of *Pf dhps* gene we used a PCR-RFLP and PCR allele-specific methodology. **Results:** We found that 84% of samples harbored a quadruple mutant genotype N51I/S108N/I164L/insertion Bolivia repeat, and the left 16% of the sample contained an infection with a simple mutant genotype (S108N). Regarding the *Pf dhps* gene, we found four genotypes, the triple mutant genotype A437G/K540E/A581G was the more frequent (78%). **Conclusions:** We observed that the mutations I164L and K540E, known as highly predictor to SP resistance, in this group of patients with SCM were twice of frequency of the mutations from patients with NCM from published reports, also in the same area and period of study.

I. INTRODUCCIÓN

EPIDEMIOLOGÍA DE MALARIA

La malaria o paludismo es la enfermedad metaxénica parasitaria más importante a nivel mundial. Es producida por un protozoo que pertenece al Phylum Protozoa, Subphylum Apicomplexa, Clase Sporozoa, Subclase Coccidiida, Suborden Haemosporina, Familia Plasmodiidae y Género Plasmodium. Existen 4 especies principales del género Plasmodium que son las responsables de la infección en humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, cada una de las cuales produce un tipo de malaria con sintomatología diferente (1). Recientemente se ha reportado a una quinta especie causante de malaria en humanos, *P. knowlesi*, reportado en el continente Asiático, principalmente en Malasia (2).

P. vivax y *P. falciparum* son las especies que causan la mayoría de casos de malaria en el mundo. *P. vivax* es considerado no letal y es causa en la mayoría de las veces de malaria no complicada (MNC). *P. falciparum* por su parte es considerada letal y además es causante de la mayoría de casos en el mundo, porque además de causar MNC también causa los casos de malaria severa y/o complicada (MSC).

La malaria es una enfermedad transmitida por vectores donde el ser humano es el hospedero vertebrado y el mosquito *Anopheles* spp es el vector invertebrado. Las principales especies transmisoras de malaria reportadas en el Perú son *A. albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, *A. darlingi* y *A. benarrochi* (3). De ellos, *A. darlingi* es el más activo y frecuente en Iquitos (90%) (4,5) y ha sido asociado con el incremento de casos de malaria por *P. falciparum* en Loreto durante la década del '90 (6–8). Desde entonces, *A. darlingi* es considerado como el principal vector de transmisión de *P. falciparum* en nuestro país (4).

La malaria se extiende por 97 países y territorios con una intensidad de transmisión variable (9). Se calcula que el 45% de la población mundial vive en zonas donde la malaria es endémica, principalmente áreas tropicales de bajos recursos como partes de África, Asia, Medio Oriente, América del Sur y América Central (9). En el año 2013 se reportaron 198 millones de casos de malaria y más de medio millón de muertes, siendo la mayoría de ellos en niños menores de cinco años en África (9). Del

total de muertes en el mundo durante el año 2013, cerca de 1000 casos fueron reportados en Latinoamérica, correspondiendo al 0.14% (9).

En el Perú, la malaria está presente en 14 de los 24 departamentos, siendo *P. falciparum* y *P. vivax* las especies prevalentes con 16% y 84% de frecuencia respectivamente (10,11). Se estima que el 16% de la población vive en zonas de bajo a alto riesgo de transmisión de malaria (alto riesgo: incidencia >1caso/1000habitantes/año; bajo riesgo: incidencia >0 y ≤1casos/1000habitantes/año) (9), que incluyen principalmente a la Selva Amazónica, Selva Central y Selva Sur. De estas la Selva Amazónica y principalmente el departamento de Loreto, es la que reporta la mayor proporción de casos totales de malaria en el Perú. Según el reporte del año 2014, 93% de los casos se reportaron en Loreto, con 99% de casos de infección por *P. falciparum* y 92% de los casos de infección por *P. vivax* (10) (anexo 1).

El número de casos de malaria en nuestro país ha variado mucho durante los últimos 30 años. La malaria estuvo cerca a erradicarse durante el año 1960 con sólo 1,500 casos en el año 1965 (12), sin embargo re-emergió y se observó un incremento sostenido de casos de infección por *P. falciparum* principalmente desde el año 1994 (10 mil casos reportados en el año 1994) (13,14), hasta llegar a un máximo de casos durante el brote del año 1998 y 1999, con 212,000 casos totales de malaria en el año 1998 (15). En esa oportunidad se registraron más de 70,000 casos de infección por *P. falciparum* en el año 1998 y 60,000 en el año 1999 (15), que incluyeron 43 casos fatales en el año 1998 (12) y 992 casos de MSC con 49 casos fatales en el año 1999 (16). Fue durante el año de 1998 que se realizó el estudio de investigación de donde provienen las muestras de ADN para esta tesis.

Los factores principales asociados al incremento de casos fueron: la ocurrencia del Fenómeno del Niño, la inserción de una nueva especie del vector (*A. darlingi*, posiblemente inserido desde Brasil) y la dispersión de fármaco-resistencia a los antimaláricos usados en la región (6,7,17). Ya después del año 2000, debido principalmente al cambio de tratamiento antimalárico, el número de casos empezó a disminuir y en estos últimos años se ha mantenido sin variación significativa (7,18). Durante el año 2014 se reportó un total de 64,676 casos totales de malaria, y 10,282 casos de malaria por *P. falciparum* con 4 defunciones (MINSA 2014).

Los síntomas clínicos de la malaria pueden ser variados, desde ausentes o muy

leves hasta severos, pudiendo ocasionar incluso la muerte del paciente. Los síntomas más comunes de la MNC son dolor de cabeza, escalofríos y fiebre y la frecuencia de su ocurrencia depende de la especie del parásito infectante. Al igual que los síntomas, el tratamiento también depende de la especie infectante, siendo así que en nuestro país se usa el tratamiento combinado de artesunato y mefloquina para malaria por *P. falciparum* y cloroquina con primaquina para los casos de malaria por *P. vivax*.

En infecciones por *P. falciparum* los síntomas son muy variables. La frecuencia de paroxismos (escalofríos, fiebre y sudoración) es irregular, que más adelante se presenta a intervalos de 36 a 48 horas. La presentación clínica de la enfermedad es usualmente indistinguible al de la influenza y otras enfermedades febriles, y aunque el diagnóstico de laboratorio puede ser certero, la malaria por *P. falciparum* muchas veces puede complicarse rápidamente y comprometer la salud del paciente (19). La complicación de los síntomas conlleva a la falla multi-orgánica, observándose una enfermedad fulminante y posterior muerte del paciente infectado, por lo que a la malaria producida por esta especie también se le conoce también como “terciana maligna” (19). Los casos severos y de muerte de malaria son causados principalmente por *P. falciparum*, sin embargo *P. knowlesi* y raramente *P. vivax* y también pueden producir complicaciones (19,20).

MALARA SEVERA Y/O COMPLICADA

La OMS define a la malaria severa y/o complicada como: “el síndrome agudo en que la patología microvascular es producida en gran parte al secuestro de células rojas y liberación de citoquinas, el cual compromete a múltiples órganos, ocasionando malaria cerebral, edema pulmonar, falla aguda renal, anemia severa y/o hemorragia”, esta disfunción de órganos vitales se evidencia por información clínica o laboratorial (19,21). El programa de control de la malaria en el Perú considera caso grave cuando el paciente infectado por *P. falciparum* presenta cualquiera de las siguientes manifestaciones clínicas: deterioro en el nivel de conciencia, anemia severa, parasitemia elevada, compromiso renal, hepático y pulmonar, entre otros, tal como se muestra en la tabla a continuación.

Tabla de criterios de gravedad definido por el MINSA, 2007.

CRITERIOS	DEFINICIÓN
Características clínicas de malaria severa	
Postración	Debilidad marcada
Compromiso de conciencia	Escala de Glasgow < de 14
Convulsiones generalizadas	≥ 1 convulsión en 24 horas
Dificultad respiratoria	Edema agudo pulmonar o Síndrome de Dificultad Respiratoria del Adulto
Hipotensión	PA Sistólica < 70mmHg
Insuficiencia renal aguda	Adulto: Diuresis < 0.5cc/Kg/hora Niño: Diuresis < 12ml/Kg/24 horas
Hiperpirexia	T corporal axilar > 39°C persistente
Hallazgos de Laboratorio y otros	
Hipoglicemia	Glicemia < *40-60mg/dl
Acidosis metabólica	pH < 7.25 ó Bicarbonato < 15mEq/L
Anemia normocítica severa aguda	Hcto: < 15% ó Hb: <5.0 g/dl en niños* Hcto: < 21% ó Hb: <7.0 g/dl en adultos
Hemoglobinuria malárica	Orina pardo oscura, o rojisa, proteinuria
Hiperparasitemia	4+ (>100,000 parásitos/μL), > 5% de GR con formas asexuadas
Hiperlactacemia*	Lactato > 5mmol/L
Falla Renal*	Creatinina en suero > 265μmol/L
Ictericia	Bilirrubina Total > 3g/dl (clínica)
Hiperpirexia	T corporal axilar > 39°C persistente
Transtorno de la coagulación	Recuento plaquetario < 50,000/ml, Sangrado espontáneo
Edema pulmonar*	Radiológico

Fuente: MINSA, 2007 Norma técnica de salud para la atención de la malaria y malaria grave en el Perú, 2007. NTS N°054-MINSA/DGSP-v.01. *Modificado de acuerdo al Manual de manejo de casos de Malaria Severa por la Organización Mundial de la Salud (19).

La anemia severa, hipoglicemia, y convulsiones son más comunes en niños, mientras que la falla renal, ictericia y edema pulmonar son los más comunes en adultos (22). La malaria cerebral, shock y acidosis, que frecuentemente terminan en falla respiratoria, pueden ocurrir a cualquier edad (22). Las complicaciones más frecuentes reportadas en un estudio de 1997 en la región Amazónica fueron anemia severa (42%) malaria cerebral (25%), hipoglicemia (23%), insuficiencia renal aguda (16%) y neumopatía aguda (13%) (23).

La malaria severa es considerada una emergencia médica y el principal objetivo del tratamiento es prevenir la muerte del paciente (19). En la fase inicial de la enfermedad (malaria no complicada) la tasa de letalidad para los que no reciben tratamiento es del 10-20% (24) y la probabilidad de muerte por malaria se reduce en 50% si el paciente recibe tratamiento antimalárico, siendo de aproximadamente 0.1% si

la cepa es sensible (25). En el caso de un paciente con MSC, si este recibe tratamiento la mortalidad llega a estar entre 15 a 20% (referencia de White 1999b) y 100% si no recibe tratamiento (24).

El manejo de un paciente con malaria severa generalmente comienza en el centro de salud o sala comunal de su localidad y el tratamiento que recibe el paciente es para malaria no complicada (tratamiento de primera línea). Si se diese el caso que la cepa del parásito que está produciendo la enfermedad fuese resistente al antimalárico de primera línea, éstos continuarían multiplicándose dentro del paciente y llevaría a la intensificación de la enfermedad, la cual puede ocurrir en pocas horas debido a la eliminación ineficiente de los parásitos (24). Por eso es muy importante que el diagnóstico, tratamiento y el manejo clínico del paciente con MSC sea rápido y adecuado, y que estos sean realizados dentro de una unidad de cuidados intensivos (UCI) de un hospital (21). Desafortunadamente, los dos únicos hospitales que cuentan con una UCI en el departamento de Loreto se localizan en la ciudad de Iquitos, aumentando así el riesgo de complicaciones para MSC para los pacientes que viven lejos de la ciudad (26–28). Esto fue un factor de riesgo importante identificado en los casos de malaria severa durante los años 1996-1999, donde el tiempo que transcurría desde el inicio de síntomas hasta el inicio del tratamiento en estos pacientes fue de más de dos días (16).

El manejo clínico y de cuidado (enfermería) de MSC es muy complejo y requiere un grupo dedicado para evitar la muerte del paciente (19). El tratamiento de MSC según el Ministerio de Salud de nuestro país (RM 116-2015 que modifica la norma técnica N°54-2005) y según el último manual de la Organización Mundial de la Salud contempla a artesunato vía intravenosa y clindamicina (19,29,30). Este tratamiento debe ser realizado necesariamente por cualquier vía parenteral por un mínimo de 24 horas para garantizar un tratamiento rápido, luego de esto el tratamiento puede seguir la dosis completa del tratamiento por vía oral. En el caso de gestantes con MSC se recomienda administrar quinina y clindamicina durante el 1er trimestre y artesunato con clindamicina durante los demás meses de gestación. No se recomienda el uso de quinina durante los últimos meses de gestación debido a que está asociado con un 50% de riesgo de hipoglicemia en las gestantes (19). El uso de SP en este grupo de pacientes está recomendado, aunque puede producir contra-indicaciones en el último

trimestre de gestación (22). Actualmente el número de casos de MSC es considerablemente bajo comparado con el periodo 1998-1999, sin embargo, se encuentra dentro del plan de vigilancia del MINSA debido a la letalidad y determinantes multifactoriales de su ocurrencia, donde se reporta semanalmente el número de defunciones causados por MSC (11).

Las manifestaciones clínicas de severidad dependen de muchos factores, siendo considerados la edad y características inmunológicas las más importantes (22,31). La población en riesgo de sufrir malaria severa incluye principalmente a 4 grupos específicos: a 1) niños menores de 5 años de edad, 2) mujeres gestantes, 3) ancianos y 4) personas con escasa inmunidad (21,24,32). En lugares de transmisión alta (prevalencia de parasitemia > 50% y mayoría de casos en niños 2-9 años), el riesgo de tener MSC es alta en niños y visitantes que provienen de áreas no endémicas, mientras que en otras áreas, la MSC se distribuye homogéneamente entre todos los grupos etarios (19). El riesgo de severidad se incrementa en las mujeres durante el segundo y tercer trimestre de embarazo, en pacientes con HIV/SIDA y en personas que hayan sido sometidas a una esplenectomía (19). La presencia de parasitemia alta (>100,000 par/μL) es un factor de riesgo muy alto para la muerte por MSC por *P. falciparum*, pero su relación con la prognosis de la enfermedad varía de acuerdo al nivel de transmisión de malaria en el área geográfica y también al genotipo del parásito respecto a su virulencia (33,34)(34). Por ejemplo en un estudio de MSC en Colombia mostró que el valor de corte de 50,000 par/μL era adecuado para esa región, ya que el 50% de los casos de MSC presentaron una parasitemia mayor a ese valor y ninguno de los casos de MNC presentaron esa parasitemia (35).

Otro factor asociado con el riesgo de MSC es la exposición previa al tratamiento de malaria (16). El riesgo de tener MSC es alto si un paciente con MNC no es tratado oportunamente ni de forma adecuada (1era línea de tratamiento) (19,25,36). Siendo así que uno de los factores asociados con el aumento de casos de malaria severa en la región Loreto en los años 90's fue el tratamiento inoportuno y retraso del diagnóstico de MNC (16). Bardales y col. mostraron que los pacientes que no se curaron después de recibir la primera línea (CQ) y segunda línea (SP) de tratamiento fueron los que más complicaciones presentaron en el momento de su ingreso al hospital y durante su evolución en la UCI (23). Asimismo, Zamora y col. determinaron tres factores de riesgo

para desarrollar malaria severa en Loreto: recibir atención por familiares y/o curanderos al inicio de la enfermedad, recibir remedios caseros y sintomáticos al inicio de la enfermedad y no frecuentar sitios maláricos (Zamora 2001).

Por eso un tratamiento eficaz junto con un diagnóstico certero de la MNC son claves para el control de la enfermedad y prevención de la muerte producida por MSC, especialmente en niños pequeños y mujeres embarazadas que son un grupo con un alto riesgo de complicaciones (19). Sin embargo, la MSC se puede desarrollar tan rápido que muchas veces el tratamiento oportuno de MNC puede ser insuficiente para detener el curso de la enfermedad, especialmente en niños (19).

FARMACORESISTENCIA

El tratamiento de la malaria, entonces dependerá de la severidad de la infección, la edad del paciente, el patrón de susceptibilidad a los antimaláricos en el área geográfica y de la especie diagnosticada (22). Esto sugiere que para que se lleve a cabo un tratamiento adecuado y poder prevenir las complicaciones por MSC, es importante también conocer sobre la presencia de fármaco-resistencia del parásito a los antimaláricos en el área geográfica de donde provienen los casos.

La fármaco-resistencia a los antimaláricos se define como: “la capacidad de la cepa del parásito para sobrevivir o multiplicarse, a pesar de la administración y la absorción del medicamento dado en dosis iguales o mayores que las usualmente recomendadas, pero dentro de los límites de tolerancia del sujeto, con la advertencia de que el formato de la droga activa contra el parásito debe ser capaz de ganar el acceso al parásito o a la célula infectada durante el tiempo necesario para su acción normal” (24). La resistencia a drogas ha sido confirmada en sólo 2 especies de las 4 especies de malaria que afectan a humanos: *P. falciparum* y *P. vivax* (37,38).

Otra definición importante sobre resistencia a antimaláricos es el término: “fracaso terapéutico”, el cual particularmente en *P. falciparum* está definido como la reaparición del parásito en las gotas gruesas de los días de control post-tratamiento día-7, 14 y/o 28 (MINSA 1996). La clasificación de resistencia clínica a sulfadoxina-pirimetamina según la OMS es como sigue: Sensible: eliminación de parasitemia para el día-14, sin recurrencia; tipo RI como la desaparición de parasitemia en el día 3 seguido de una parasitemia recurrente entre los días 4 y 14; tipo RII cuando presenta una

parasitemia positiva en el día 3, una disminución de más del 75% de parasitemia comparado al día-0 seguido de un subsecuente aumento de parasitemia en el día 7; finalmente el tipo RIII que presenta una o no disminución de parasitemia o disminución de menos del 75% para el día-3 (39,40).

El primer reporte oficial de fármaco-resistencia de *P. falciparum* en nuestro país fue realizado por el Ministerio de Salud en el año 1993 en el límite de San Martín con Loreto (7,41). En ese entonces, en nuestro país se usaba cloroquina (CQ) como primera línea de tratamiento antimalárico para el estadio eritrocítico de todos los casos de MNC (7). Luego de conocerse en el año de 1996 sobre la dispersión de la fármaco-resistencia de *P. falciparum* a CQ, se decidió el cambio del tratamiento a uno combinado con los antimaláricos sulfadoxina – pirimetamina (SP) (8).

Sin embargo, para el año 1998 cuando los casos de malaria por *P. falciparum* se incrementaron notablemente, la resistencia al nuevo tratamiento ya se había extendido en toda la región Amazónica (de 5% a 60% en toda la región), introduciendo nuevamente la necesidad de un estudio de “eficacia a antimaláricos” para esta especie (7,8,42). En el año 2001, gracias a la evidencia de resistencia a SP en dos estudios de eficacia *in vivo* desarrollados por el MINSA en colaboración con NAMRU-6 (42–44), se decidió nuevamente cambiar el esquema de tratamiento de MNC por *P. falciparum* a una terapia combinada de mefloquina- artesunato (MQ-AS) para la región Amazónica y de SP- AS para la Costa Norte (8,45), la cual se mantiene con una eficacia alta hasta ahora (46). A partir de este año (2015) se incluyó en nuestro país al antimalárico primaquina como parte del esquema combinado de MQ-AS para todas las regiones del país, para el caso de mujeres gestantes durante el 1er trimestre de gestación y niños menores de 6 meses se usará la segunda línea de tratamiento (RM N°116-2015 MINSA) (29). El anexo 2 comprende la evolución de los esquemas de tratamiento para malaria por *P. falciparum* en nuestro país desde el año 1990 hasta la actualidad.

Existen básicamente 3 métodos para el estudio de la fármaco-resistencia de *P. falciparum* a los antimaláricos: estudios *in vivo*, estudios *in vitro* y caracterización molecular (47), de estos, el estudio *in vivo* es considerado el “gold standard” (48) y los estudios moleculares están tomando cada vez más una mayor importancia en salud pública (49). En los estudios *in vivo*, al paciente con diagnóstico de malaria se le administra el fármaco bajo observación y se le monitorea durante un tiempo para

determinar si el fármaco logra eliminar al estadio eritrocítico circulante en sangre; en el caso de SP se mide la parasitemia durante los días 1, 2, 3, 7, 14, 21, and 28 (43,44). En los estudios *in vitro*, se obtiene la sangre de los pacientes infectada con malaria para realizar el cultivo y luego exponer a los parásitos a diferentes concentraciones de fármacos antimaláricos tales como: CQ, SP, MQ y AS y evaluar así la inhibición de crecimiento del parásito (47,50). El método *in vitro* evalúa el fenotipo del parásito excluyendo los factores de inmunológicos y fisiopatológicos del hospedero, sin considerar la eficacia de la pro-droga que es producto del metabolismo del antimalárico dentro del paciente, que puede variar dentro cada individuo (48). Finalmente, los estudios de caracterización molecular permiten mostrar diferencias en los segmentos de la secuencia del ADN del parásito (marcadores moleculares) e identificar mutaciones que estén asociadas con resistencia a antimaláricos (marcadores moleculares de resistencia) (47). La identificación de mutaciones asociadas con resistencia se realiza dentro de estudios *in vivo* y/o *in vitro*, donde se tiene información de la respuesta del parásito al antimalárico (fenotipo del parásito) (51).

El uso de técnicas moleculares que utilizan el ADN del parásito se ha incrementado en las dos últimas décadas y ha cobrado mucha importancia como método para el estudio de resistencia a los antimaláricos (39), prediciendo potenciales fallas en el tratamiento, tanto a nivel individual como a nivel poblacional (52). Dentro de estas técnicas moleculares, el PCR alelo-específico, el secuenciamiento de ADN y el PCR-RFLP son los más reportados para el estudio de estos marcadores moleculares.

El PCR alelo-específico usa la enzima polimerasa para amplificar selectivamente cada alelo (con mutación o sin mutación) mediante el uso de cebadores específicos. Este método, aplicado al estudio de mutaciones en *P. falciparum*, fue propuesto por Peterson y col. donde utilizan tres PCRs para la identificación de tres alelos (S108, S108N y S108T) en el codón 108 de *Pf dhfr* en la región amazónica de Brasil (53). En el caso del secuenciamiento de ADN (obtención de la secuencia de nucleótidos de un segmento de ADN) usa la enzima polimerasa y dNTPs modificados que permite la elongación de fragmentos de diferentes tamaños de una sola de las hebras del ADN. Esto permite deducir la secuencia de ADN por medio de la emisión de una luz fluorescente específica para cada uno de los cuatro nucleótidos modificados, éste método es conocido como secuenciamiento de Sanger. El PCR-RFLP consiste en amplificar una región genómica

específica de interés, y luego se realiza una digestión enzimática con enzimas de restricción cuya área de corte se sitúa en el alelo mutante o silvestre, obteniéndose fragmentos de diferente tamaño para cada alelo. Para la ejecución de este trabajo, se utilizaron los tres métodos mencionados.

MARCADORES MOLECULARES DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO COMBINADO SULFADOXINA-PIRIMETAMINA

Debido a que sulfadoxina-pirimetamina fue el tratamiento antimalárico combinado usado durante la epidemia de malaria del 1998 y por ende durante el periodo de enrolamiento de los casos de malaria severa de este estudio, esta tesis evaluó los marcadores moleculares en los genes que codifican a las enzimas de la vía metabólica de los folatos, blanco de esas drogas (anexo 3).

Los marcadores moleculares que han sido plenamente asociados con resistencia a pirimetamina y sulfadoxina en *P. falciparum* incluyen mutaciones puntuales en dos genes de la vía de los folatos: *Pfdhfr* (gen que codifica la enzima dihidrofolato reductasa de *P. falciparum*, 231 aa) (54,55) y *Pfdhps* (gen que codifica la enzima de dihidropterato sintasa de *P. falciparum*, 199 aa) (56,57). El gen *Pfdhfr* se encuentra ubicado en el cromosoma 4 (54) y el *Pfdhps* de en el cromosoma 8 (57). Ambas enzimas codificadas por estos genes forman a su vez complejos bifuncionales llamados DHFR- TS (DHFR- Timidilato sintasa) y DHPS- PPPK (DHPS- 7,8-dihidro-6-hidroximetilpterina pirofosfoquinasa) (anexo 3). Los sustratos para las enzimas DHFR y DHPS del parásito son el ácido fólico y PABA (ácido Para-amino-benzoico), respectivamente (59,60). La descripción de cada gen se puede encontrar en la Base de Datos pública del genoma de Plasmodium, PlasmoDB (58).

Cuando el paciente recibe tratamiento, los metabolitos de las drogas compiten con los sustratos de las enzimas por el sitio activo de las enzimas que en condiciones naturales forman parte de la vía de los folatos (inhibición competitiva) (51,61) (anexo 3). Esta produce una inhibición de la vía de los folatos en el parásito la cual afecta su replicación (síntesis de ADN interrumpida) y posteriormente produce su muerte (17,62,63). Sin embargo, el parásito desarrolló mecanismos de resistencia al tratamiento por medio de la selección de mutaciones puntuales en los genes que codifican estas enzimas (39,64). Estas mutaciones alteran el funcionamiento de la proteína codificada

(Cowman et al. 1988), produciendo así un cambio en la interacción enzima-sustrato del parásito y que afecta la unión de la droga con la enzima del parásito y consecuentemente produce una resistencia al antimalárico y sobrevivencia del mismo dentro del paciente (39,51)

Las mutaciones puntuales en el gen *Pfdhfr* que se han reportado como asociadas a conferir resistencia a pirimetamina en el parásito son: A16V, C50R, C51R, C59R, S108N, S108T, I164L (39,66) y la presencia de una inserción de 15 pares de bases (pb): GGG AAA AAA AAT GAG localizada entre los codones 30 y 31 denominada “Repetición Bolivia” que fue reportada por primera vez en Bolivia (Plowe et al. 1997; Basco & Ringwald 1998b). Esta inserción se localiza cerca del sitio activo de la enzima (39). La mutación S108T no ha sido reportada en la población peruana, pero se decidió incluirla en el análisis de la tesis para documentar todas las mutaciones posibles.

Para el caso de resistencia a sulfadoxina, las mutaciones reportadas en el gen *Pfdhps* son: A436F, A437G, K540E, A581G y S613A y S613T, éste último no ha sido publicado en aislamientos peruanos ni de Sudamérica (51,68). En ambos genes se ha observado que el número de mutaciones está directamente relacionado con el nivel de resistencia tanto *in vitro* como *in vivo* (52,59,69).

Actualmente, el tratamiento de primera línea para la MSC es el Artesunato, al igual que para MNC. Afortunadamente por el momento no se tiene reportes de resistencia a Artesunato o derivados de artemisina en nuestra región, pues los casos de resistencia a este antimalárico en el mundo aún se encuentran focalizados en 5 países de Asia: Camboya, Laos, Tailandia, Vietnam y Myanmar (9). Sin embargo, *P. falciparum* ha desarrollado resistencia a casi todos los antimaláricos disponibles y el riesgo de dispersión de multidrogo-resistencia es elevado, existiendo el riesgo de una rápida dispersión como ha ocurrido con otros antimaláricos en el pasado.

El objetivo de este trabajo fue describir la prevalencia de mutaciones en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* en muestras de pacientes con el cuadro clínico de malaria severa y/o complicada (MSC) y su posterior comparación de esta frecuencia con los reportes de la literatura en la población con malaria no complicada (MNC) durante el mismo periodo de estudio en la región Amazónica.

II. METODOLOGÍA

i. Objetivos e hipótesis

1. Objetivo general

Evaluar la prevalencia de mutaciones en los genes que codifican a las enzimas dihidrofolato reductasa (*Pfdhfr*) y dihidropterato sintasa (*Pfdhps*) de *Plasmodium falciparum* en muestras de pacientes con malaria severa y/o complicada, del Banco de muestras biológicas del NAMRU-6.

2. Objetivos específicos

- Describir las características clínico-demográficas de los pacientes con malaria severa y/o complicada.
- Determinar la prevalencia de mutaciones simples, dobles, triples, cuádruples y quintuples en *Pfdhfr* y *Pfdhps* en las muestras de estudio.
- Determinar la ocurrencia de la inserción Repetición Bolivia en *Pfdhfr* en las muestras de estudio.

ii. Línea de investigación y diseño de estudio

Investigación dentro de las líneas de investigación de Malaria y Medicina Molecular.

1. Diseño de estudio

Estudio descriptivo, observacional y transversal, no hubo intervención por parte del investigador y sólo se hizo una sola medición de los datos en el participante.

El estudio de tesis aquí propuesto fue un estudio secundario que usó muestras biológicas (caracterización molecular del parásito *P. falciparum*) e información clínico-demográfica (edad, género y servicios de atención) y de laboratorio (parasitemia) de los pacientes participantes del “estudio fuente”: “Investigación de la Malaria severa y/o complicada en Iquitos, Perú” (traducción no oficial de

“Investigation of Severe and Complicated Malaria in Iquitos, Peru”), desarrollada por el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales NAMRU-6.

2. Población y muestra de estudio

2.1 Población de estudio y aprobación del comité de ética del **Estudio Fuente**

El estudio original *in vivo* fue conducido en el Hospital de Iquitos por el Dr. Richard Witzig investigador de la Universidad de Tulane, New Orleans-USA, conjuntamente con el Ministerio Nacional de Salud (MINSA) y la Dirección Regional de Salud de Loreto. El diseño fue una cohorte prospectiva de pacientes con MSC de los servicios de Medicina, Pediatría y Obstetricia del Hospital Apoyo de Iquitos de la ciudad de Iquitos - departamento de Loreto, durante el año 1998. Posteriormente el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6) como institución colaboradora del estudio original preparó un protocolo para la ejecución de la investigación de los casos de MSC en ese grupo de pacientes, bajo aprobación del Comité de Ética Institucional NMRC.D.2007.0002 que está vigente a la fecha. El **estudio fuente** enroló a 80 pacientes desde el 2 marzo 1998 hasta el 31 diciembre de 1998. Los pacientes con un diagnóstico de MSC que entraron a los servicios de atención fueron elegidos y enrolados siguiendo los criterios de inclusión de la definición de caso por la OMS (anexo 4). Al finalizar el estudio se confirmaron 67 casos con infección positiva para *P. falciparum*.

2.2 Muestra de estudio de esta tesis

Se incluyó a las 67 muestras biológicas positivas para *P. falciparum*. No se hizo ningún cálculo de tamaño muestral porque se trabajó con toda la población de pacientes con MSC. Hubo dos casos que no fueron en estricto casos de MSC pues no cumplieron los criterios de inclusión del estudio fuente, este análisis fue desarrollado por el investigador principal (figura 1), por lo que se les excluyó del presente estudio de tesis.

Se hizo un PCR confirmatorio a todas las 67 muestras para identificación de infecciones mixtas de *P. falciparum* con *P. vivax* para excluirlos del análisis. El fluxograma de trabajo se encuentra en la figura 1.

Criterio de inclusión

Muestras de pacientes con malaria severa y/o complicada cuya reacción de PCR de determinación de especie causante sea positiva a *P. falciparum*.

Criterio de exclusión

Diagnóstico confirmatorio por PCR positivo para *P. vivax* únicamente o como parte de infecciones mixtas juntamente con *P. falciparum*.

iii. Operacionalización de variables

Las variables analizadas se agruparon en dos grupos: variables de Datos clínico-demográficos (edad, género, parasitemia y servicio de atención) y variables de Caracterización molecular (mutaciones puntuales y genotipos). Las variables de datos clínicos demográficos fueron usadas en el mismo formato que fueron obtenidas de la base de datos, es decir no se categorizaron. Las variables de caracterización molecular se generaron utilizando procedimientos de laboratorio que más adelante se exponen. La descripción de cada una de las variables se encuentra en detalle en la tabla de operacionalización de variables (tabla 1).

A continuación se definen algunos términos de biología molecular que se utilizaron dentro de la tesis.

1. Mutación puntual: definida como el cambio en un nucleótido en la secuencia nucleotídica. Si esta mutación ocasiona un cambio de aminoácido se le denomina mutación no-sinónima. Por ejemplo, en la mutación S108N de *Pfdhfr* el lado izquierdo del número de codón denota el aminoácido que se encuentra en la cepa sensible y el derecho denota el aminoácido que ha cambiado (mutante), esto en el codón 108 del gen. Como referencia se ha tomado la revisión de Den Dunnen (70).

2. Genotipo: debido que el parásito *Plasmodium* es haploide cuando está en su ciclo biológico dentro del ser humano, los genotipos o haplotipos descritos estarán definidos como la secuencia de mutaciones puntuales en un determinado gen. Por ejemplo S108N/I164L de *Pf dhfr*, indica que el gen presenta mutaciones que generaron cambio de 2 aminoácidos en su secuencia y están en los codones 108 y 164 del gen.
3. Alelo: Un alelo es una de las formas alternativas que tiene el gen o una región de ADN específica (71). En nuestro caso hablaremos de alelo silvestre o no mutante y alelo mutante.
4. Inserción: esta puede deberse a diferentes mecanismos, entre ellos un error al momento de la replicación del ADN que luego se selecciona por ofrecer al parásito una mayor adaptabilidad por proceso compensatorio, como ocurrió en el caso de la repetición Bolivia (72). La inserción “Repetición Bolivia” (RB) es una repetición de 5 nucleótidos, de los codones del 26 al 30 del gen *Pf dhfr* como se observa en el gráfico de abajo.

Inserción Repetición Bolivia:

Codons	23	24	25	26	27	28	29	30						31	32
Wild type	aaa	aat	gag	ggg	aaa	aaa	aat	gag	gtt	ttt
	Lys	Asn	Glu	Gly	Lys	Lys	Asn	Glu						Val	Phe
Bolivia repeat	aaa	aat	gag	ggg	aaa	aaa	aat	gag	ggg	aaa	aaa	aat	gag	gtt	ttt
	Lys	Asn	Glu	Gly	Lys	Lys	Asn	Glu	Gly	Lys	Lys	Asn	Glu	Val	Phe

Fuente: Plowe 1998 (39).

5. Número de mutaciones: para esto se usó la siguiente clasificación modificada de la presentada por Salas en su tesis de maestría (73):

5.1 Gen *Pfdhfr* según reportes de Perú

N° de mutaciones	Mutaciones						Genotipo
	BR	C50R	N51I	C59R	S108N	I164L	
Simple (1M) ^{*†}	No	C50	N51	C59	S108N	I164	S108N
Doble (2M) [*]	No	C50	N51	C59	S108N	164L	S108N/164L
Triple (3M) [*]	No	C50	N51I	C59	S108N	164L	N51I/S108N/I164L
Cuádruple (4M) ^{*†}	BR	C50	N51I	C59	S108N	164L	BR/N51I/S108N/I164L
Quíntuple (4M) [†]	BR	C50R	N51I	C59	S108N	I164	BR/C50R/N51I/S108N

^{*}Reportado por Kublin 1998 y [†]Bacon 2009 (74,75). La mutación C59R ha sido reportada por Plowe 1997 en Bolivia, pero no en Perú (39). RB, Inserción “Repetición Bolivia”.

5.2 Gen *Pfdhps* según reportes de Perú

N° de mutaciones	Mutaciones					Genotipo
	S436A	A437G	K540E	A581G	A613	
Silvestre (S) [†]	S436	A437	K540	A581	A613	Silvestre
Doble (2M) [†]	S436	A437G	K540	A581G	A613	A437G/A581G
Triple (3M) ^{*†}	S436	A437G	K540E	A581G	A613	A437G/K540E/A581G
Cuádruple (4M)	S436A	A437G	K540E	A581G	A613	S436A/A437G/K540E/A581G

^{*}Reportado por Kublin 1998 y [†]Bacon 2009 (74,75). Las mutaciones A613S/T y S436A ha sido reportada en África, pero no en Perú (39).

5.3 Genotipos combinados de *Pfdhfr* y *Pfdhps*

Genotipo combinado <i>Pfdhfr</i> / <i>Pfdhps</i>	Genotipo de <i>Pfdhfr</i>	Genotipo de <i>Pfdhps</i>
Simple (1M)	Simple (1M)	Silvestre
Cuádruple (4M)	Simple (1M)	Triple (3M)
Cuádruple (4M)	Cuádruple (4M)	Silvestre
Séxtuple (6M)	Cuádruple (4M)	Doble (2M)
Séptuple (7M)	Cuádruple (4M)	Triple (3M)
Óctuple (8M)	Cuádruple (4M)	Cuádruple (4M)

iv. Consideraciones éticas del estudio de tesis

Los objetivos y procedimientos desarrollados en el presente estudio forman parte de los objetivos y protocolo del Estudio Fuente. El presente trabajo de tesis fue presentado a la Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su aprobación, y fue aprobado bajo Resolución de decanato N.º 0038-D-FM-2014. En este estudio se mantuvo la confidencialidad de los participantes, utilizando una base de datos que no incluyó nombres ni otros datos personales de identificación de los participantes, sino únicamente códigos. Los procedimientos de laboratorio se realizaron en el laboratorio del Departamento de Parasitología y en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos de América, NAMRU-6.

v. Plan de análisis de datos

En el análisis descriptivo se reportaron las frecuencias de las variables categóricas género, número de mutaciones y genotipos. Para el caso de las variables numéricas se reportó la medida de tendencia central con mediana y media geométrica según sea el caso, mediana para la distribución de edad ya que no tenían una distribución normal (evaluadas visualmente con el histograma de los datos y comparando los valores de la media y mediana) y la media geométrica para la distribución de parasitemia, al observarse un sesgo a la derecha en la distribución de los datos. Adicionalmente, para la comparación de variables categóricas por centro de atención, se usaron tablas de contingencia con la prueba Chi cuadrado (χ^2) o en su defecto se usó la prueba exacta de Fisher cuando el número de celdas de comparación con valor esperado menor de 5 excedía al 20% del total de las celdas. Para la comparación de variables de edad y parasitemia por centro de atención se usó la prueba Kruskal-Wallis que es una prueba estadística no paramétrica para comparar más de dos grupos.

Adicionalmente, se comparó la frecuencia de los genotipos mutantes de los genes *Pf dhfr* y *Pf dhps* de esta tesis con los datos publicados por Salas de los casos de malaria no complicada en el departamento de Loreto (73). La decisión de la

significancia de la prueba fue de una cola, debido a que se quería demostrar que la proporción de la mutación séxtuple mutante de *Pfdhfr/Pfdhps* encontrada en el presente estudio fuese mayor que la proporción publicada en el estudio de referencia (35%), al estar este genotipo asociado con falla alta al tratamiento (Bacon, Tang, et al. 2009).

Hipótesis nula (Ho): la proporción del genotipo séxtuple mutante (*Pfdhr/Pfdhps*) en la población de estudio (p) es similar o menor a 35% (p_o).

Hipótesis alterna (Ha): la proporción del genotipo séxtuple mutante (*Pfdhr/Pfdhps*) en la población de estudio (p) es mayor a 35% (p_o).

Estadístico de prueba: $z = \frac{p - p_o}{\sqrt{\frac{p_o \times (1 - p_o)}{n}}}$ Se rechaza la H_o si $z_{obs} \geq 1.96$ o $z_{obs} \leq -1.96$

Para la comparación de los datos de esta tesis con los datos publicados por Salas (publicación de referencia) se usó el análisis de una cola con el nivel de significancia de 0.025, esto es debido a que la hipótesis alternativa fue encontrar una **mayor** proporción de genotipo mutante en las muestras de MSC respecto a los casos de MNC, y no que sea **diferente** solamente (menor o mayor). Todos los intervalos de confianza fueron calculados al 95% (IC 95%). El análisis de proporciones se llevó a cabo aplicando el teorema de límite central, debido a que el tamaño de muestra fue mayor a 25 (76).

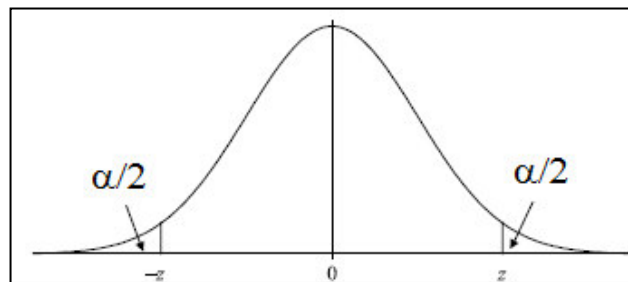


Figura que muestra que la curva de distribución normal. Donde el valor de $\alpha/2$ sería 0.025 para $|Z|=1.96$ (pag 194 de (76)).

Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico Stata v12.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA, 2011) con un nivel de significancia valor $p < 0.05$.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

A. MATERIALES

i. Material biológico

1. Muestras de estudio: Se emplearon 65 muestras de sangre total recolectadas en tubos con EDTA (como anticoagulante) que formaron parte del banco de muestras biológicas de NAMRU-6. Las muestras fueron mantenidas a -80 °C y pertenecen al laboratorio de Parasitología de NAMRU-6 de Lima

- Controles internos: Se usaron ADN de cepas de referencia de *P. falciparum* (ATCC/MR4): 3D7, D6 y W2. La cepa ATCC/MR4 3D7 es fenotípicamente sensible a pirimetamina y moderadamente resistente a sulfadoxina. La cepa D6 es sensible a pirimetamina y sulfadoxina. La cepa W2 es resistente a pirimetamina y resistente a sulfadoxina.

Estas cepas provinieron del cepario mantenido por NAMRU-6 de Lima, siendo las dos últimas gentilmente proporcionadas por el Dr. Dennis Kyle del Instituto de Investigación de la Armada Walter Reed, Silver Spring (WRAIR). Las cepas usadas han sufrido variaciones en su secuencia por los continuos sub-cultivos realizados, por lo que la secuencia de nucleótidos de los genes puede ser diferente con las secuencias reportadas por otros investigadores.

A continuación se describe los genotipos de *Pfdhfr* y *Pfdhps* en las tres cepas de referencia usados.

Tabla de cepas de referencia de NAMRU-6 usadas en esta tesis

Cepa	Origen	Genotipo de <i>Pfdhfr</i> Aminoácido/codón de nucleótidos	Genotipo de <i>Pfdhps</i> Aminoácido/codón de nucleótidos
3D7	Países Bajos	C50/N51/C59/S108/I164 TGT/AAT/TGT/AGC/ATA	S436/A437G/K540/A581/A613 TCT/GGT/AAA/GCG/GCC
D6	Sierra Leona	C50/N51/C59/S108/I164 TGT/AAT/TGT/AGC/ATA	S436A/A437/K540/A581/A613 GCT/GCT/AAA/GCG/GCC
W2	Indochina	C50/N51I/C59R/S108N/I164L TGT/ATT/CGT/AAC/TTA	S436F/A437G/K540/A581/A613S TTT/GGT/AAA/GCG/TCC

Fuente: Banco de cepas de NAMRU-6.

ii. Material no biológico

1. Reactivos

Extracción de ADN:

- Kit comercial ADN blood QIAamp mini (Qiagen, NL).

Reacción de PCR:

- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) a 1.25mM de concentración de trabajo (Invitrogen, CA, USA)
- Enzima *Taq* ADN polimerasa recombinante (5U/μL) (Invitrogen, CA, USA)
 - MgCl₂ 50mM
 - Buffer de PCR 10X (200mM Tris-HCl, pH=8.4)
- Agua para PCR libre de ADNsa/RNAasa (Gibco, CA, USA)
- Oligonucleótidos cebadores a 50μM de concentración de trabajo. Para determinar la especie de *Plasmodium* se usaron 4 cebadores sintetizados por Hospital SickKids[®] (Universidad de Toronto-Canadá) y para el caso de los genes de interés *Pfdhfr* y *Pfdhps* se usaron un total de 15 cebadores adquiridos de la compañía Proligo (SIGMA ALDRICH[®], MA, USA).

Reacción de RFLP:

- Enzima de restricción MspAII (10U/μL) (New England BioLabs, MA, USA)
- Enzima de restricción AvaII (10U/μL) (New England BioLabs, MA, USA)

Corrida electroforética:

- Marcadores de peso molecular de 100 pb (Fermentas, USA) y 123 pb (Invitrogen, CA, USA).
- Agarosa ultrapura grado analítico (Biorad, CA, USA)
- Solución tamponada TAE 50X (tris base 0.242g/L, ácido acético glacial 0.0571 ml/L, EDTA-pH8 20M)
- Buffer de carga de ADN 3X (azul de bromofenol 0.125 %, xileno cianol 0.125 %, glicerol 15%)
- Solución de bromuro de etidio a 100mg/ml (Invitrogen, CA, USA)

Purificación de productos de PCR

- Kit comercial de purificación de productos de PCR QIAquickPCR (Qiagen, NI)

Cuantificación de ADN:

- Kit de cuantificación Quant-it™ ds ADN BR assay Kit (Invitrogen, USA)

Secuenciamiento de ADN:

- Kit de secuenciamiento de ADN BigDyeTerminator v3.1 (LifeTechnology, CA, USA)
- Acetato de sodio a 3M grado molecular (SIGMA ALDRICH®, MA, USA)
- EDTA a 0.5M (pH8) grado molecular (SIGMA ALDRICH®, MA, USA)
- Alcohol 99.9% grado p.a. (Merck millipore, DEU)
- Formamida Hi-di (LifeTechnology, CA, USA)
- Buffer de corrida de secuenciamiento con EDTA 10X (LifeTechnology, CA, USA)
- Polímero Pop-7 (LifeTechnology, CA, USA)

2. Materiales de plástico y vidrio

- Gradillas y soportes para tubos y microtubos (USA Scientific)
- Guantes de latex y nitrilo (Kimberly- Clark)
- Magnetos (Fisher Scientific)
- Moldes de acrílico y peines de 14 pocillos para geles de agarosa (BioRad, USA)
- Probetas de 100 mL y 2000 mL (USA Scientific)
- Puntas de plástico con filtro para micropipetas de 10, 20, 100, 200, 1000 µL, libre de ADNasa y ARNasa (Axygen Scientific, Inc., CA, USA)
- Tubos para microcentrífuga Eppendorf de 0.2mL, 0.5mL y 1.5mL, libre de ADNasa y ARNasa (Axygen Scientific, Inc., CA, USA)
- Tubos de poliestireno de 15 mL y 50 mL (Falcon®, USA)
- Placas de plástico de 96 pocillos para secuenciamiento no ópticos (LifeTechnology, CA, USA)

- Arreglo de 16 capilares (LifeTechnology, CA, USA)

3. Equipos de laboratorio

- Agitadores magnéticos y vortex (Fisher Scientific)
- Balanza analítica (OHAUS)
- Incubadora tipo *heating block* (WWR Scientific products®)
- Horno microondas (Samsung)
- Cabina de PCR “The Clone Zone” (USA Scientific Inc., USA)
- Microcentrífugas 5417C para tubos de 1.5 mL (Eppendorf®, DE)
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL (Eppendorf®, DE)
- Termociclador para PCR GeneAmp9700 (LifeTechnologist, USA)
- Cámara de electroforesis horizontal (BioRad, USA)
- Fuente de poder para electroforesis (BioRad, CA, USA)
- Transluminador Geldoc 2000 (BioRad, CA, USA).
- Equipo de secuenciamiento ABI PRISM® 3130xL-Avant Genetic Analyser (LifeTechnology, CA, USA).
- Campana extractora para químicos peligrosos (Metálica Fernández y Cía)
- Congeladoras a -80 C, -20°C y refrigerador a 4°C
- Máquina de hielo (Scotsman, USA)
- Destilador de agua (Wheaton Instruments)
- Autoclave (Corning)

4. Programas usados

- Quantity One v4.1.6 (BioRad, CA, USA) para la edición de los geles de electroforesis.
- Sequencing Analysis v5.2 (LifeTechnology, CA, USA) para transformar los datos del secuenciador en formato .abi.
- Sequencer v4.7 (GeneCodes, MI, USA) para el alineamiento de secuencias de formato abi.
- Stata v12.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA, 2011) para el análisis estadístico de los resultados de la tesis.

B. PROCEDIMIENTOS

i. Características clínico-demográficas

La información de edad, género, parasitemia y servicio de atención de los pacientes incluidos en esta tesis fue obtenida de la base de datos del estudio fuente. Esta información se añadió a una base de datos de formato Excel juntamente con la información de caracterización molecular para su análisis.

ii. Caracterización molecular

Para generar la información de caracterización molecular del parásito *P. falciparum* se realizaron 5 procedimientos de laboratorio: extracción de ADN, PCR para la identificación de especies del género *Plasmodium* spp., identificación de mutaciones en los genes *Pfdhfr* (PCR y secuenciamiento de ADN) y *Pfdhps* (PCR-RFLP y PCR alelo-específico) y por último visualización de los productos de amplificación en gel de agarosa.

Para evidenciar cualquier posible contaminación cruzada entre muestras con genotipo de parásito mutante y no mutante se usó una reacción adicional con agua libre de ADNasa y ARNasa que fue incluida en todas las grupos de amplificación. Asimismo, el procedimiento de la extracción de ADN se realizó en un ambiente distinto al que se usó para la preparación de las reacciones de PCR y el proceso de amplificación en el termociclador o electroforesis.

Todos estos procedimientos se describen a continuación.

1. Extracción de ADN

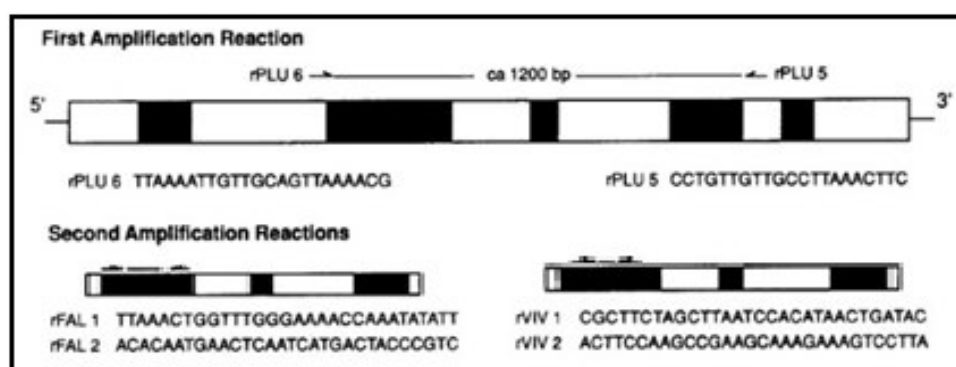
Se utilizó una alícuota de 200 µL de sangre total. Se usó el kit de extracción de ADN QIAamp® ADN blood mini kit y se siguió el protocolo para muestras de sangre total (anexo 5). El ADN fue eluido en 75 µL de Buffer EB y fue almacenado a -20°C hasta su amplificación.

2. PCR para la confirmación de especies del género *Plasmodium* spp.

Para confirmar las especies de *P. falciparum* y *P. vivax* que pudieran estar presentes

en la muestras de sangre se usó un PCR anidado descrito por Snounou, el cual es recomendado por la CDC para la identificación molecular de infección por *Plasmodium* spp. (CDC-DPDx 2013). El primer PCR identifica al género *Plasmodium* y el segundo identifica a la especie, una reacción de PCR por especie, tal como se muestra en la figura de posición de cebadores.

Posición de los cebadores usados para la amplificación del gen codificante *ssrRNA*



La figura muestra la ubicación de los cebadores usados para el 1^{er} PCR del género *Plasmodium* y para los PCRs anidados de las especies *P. falciparum* y *P. vivax*. La ubicación exacta de los cebadores se encuentra descrita en el anexo 6. Fuente: (77)

Se amplificó el gen de la subunidad ribosomal pequeña 18S (*ssrRNA*-18S), usando cebadores sentido y antisentido específicos descritos en el anexo 6. El protocolo de amplificación usado fue el publicado por Snounou (77–79), con la diferencia que se utilizaron 30 ciclos de amplificación en lugar de 20 para ambos PCRs. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 20 μ L que contenía 2mM MgCl₂, 125uM de cada cebador, 250nM de cada dNTP y 0.4U de Taq polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron una denaturación inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 2 min, hibridación de cebadores a 58°C por 2 min, una extensión de la hebra a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 5 min. Se agregó 2 μ L del ADN genómico extraído en el caso de la primera amplificación y 2 μ L del producto del primer PCR sin diluir en el caso para los PCR anidados de cada especie.

En todas las reacciones se usó un control positivo de cada especie (ADN cepa de referencia o muestra de especie conocida) y un control negativo (agua destilada libre de ADNasa/ARNasa). El tamaño del producto de amplificación fue diferente en cada especie: 205 pb para *P. falciparum* y 120 pb para *P. vivax*. Cuando las muestras tenían ADN de parásito en gran cantidad, se observó un tercer fragmento de 1200 que corresponde al producto de la primera amplificación.

3. Amplificación e identificación de mutaciones el gen *Pfdhfr*

3.1 PCR para la amplificación del gen *Pfdhfr*

Se siguió un protocolo adaptado de los descritos por Plowe y Gyang (39,80,81). Los cebadores usados y el protocolo usado se describen en detalle en los anexos 7 y 8 respectivamente. Las reacciones del 1^{er} PCR se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 50 µL con los cebadores AMP1 y AMP2. Para los casos en que no se observó banda de amplificación se hizo un PCR-anidado con los cebadores SP1 y SP2, con el propósito de incrementar el producto de amplificación de la primera reacción para el posterior secuenciamiento de ADN e identificación de genotipos. En todas las reacciones de PCR se usó un control positivo (cepa de referencia 3D7) y un control negativo (agua destilada libre de ADNasa/ARNasa). El producto amplificado tuvo un tamaño de 718 pb para el 1^{er} PCR y de 700 pb para el PCR-anidado.

3.2 Cuantificación de los productos de amplificación

Se cuantificó el producto amplificado sea del 1er PCR o PCR-anidado por medio del método turbidimétrico. Se usó el kit de cuantificación Quant-itTM dsADN BR assay Kit, el cual es recomendado para cuantificar concentraciones altas de ADN como es el caso de producto de PCR.

El procedimiento se describe a continuación, a un tubo de microcentrífuga de 600 µL se le agregó 199 µL de la solución de trabajo Quant-iTTM (reactivo Quant-iTTM-dsADN-BR diluido 1/200 en buffer Quant-iTTM-dsADN-BR) y se añadió 1 µL de producto de amplificación. Luego de mezclar en vortex por 3 segundos se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos y se leyó en el fluorímetro (provisto por el kit). La cantidad de ADN en ng/µL se calculó con la siguiente fórmula:

$\text{Concentración ADN (ng/ } \mu\text{L)} = \text{valor QF (} \mu\text{g/ mL)} \times \frac{200}{X}$

Valor QF= el valor dado por el fluorímetro Qubit™

X= el número de μL de muestra añadida al tubo de micro-centrífuga

3.3 Purificación de productos de PCR

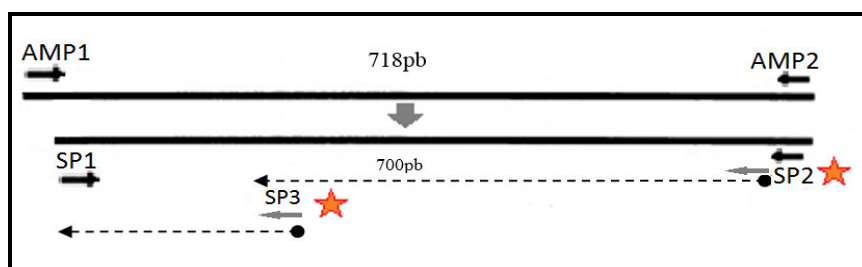
El producto de amplificación obtenido fue purificado con el objetivo de retirar el exceso de dNTPs y demás reactivos que puedan interferir con la reacción de secuenciamiento. Se usó del kit de purificación de productos de PCR QIAquick® PCR purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante como esta descrito en el anexo 9. El volumen de elución con buffer TE fue calculado para obtener una concentración final de 5-10ng/ μL . El ADN producto del PCR fue almacenado a -20°C hasta su secuenciamiento.

3.4 Secuenciamiento de ADN del gen *Pdhfr*

Con la finalidad de conocer el genotipo de *Pfdhfr*, se secuenció el fragmento de 718pb del 1^{er} PCR purificado o en su defecto del PCR-anidado. Se optó por la técnica de secuenciamiento para identificar la inserción Repetición Bolivia que ha sido reportada en Perú y otros países de Sudamérica. Se usó el kit de secuenciamiento BigDye 3.1 siguiendo el protocolo de amplificación sugerido por Applied Biosystems según se describe en el anexo 8. El kit de secuenciamiento de ADN BigDyeTerminator v3.1 (LifeTechnology, CA, USA) contiene una solución pre-mezcla con los reactivos necesarios para la amplificación (*Taq* polimerasa, dNTPs marcados con fluorocromos, di-desoxinucleótidos (ddNTPs), MgCl_2) y un control de amplificación externo (ADN plasmídico y cebador de amplificación).

Primero, se prepararon dos reacciones de amplificación (PCR modificado) por muestra de ADN, una para cada cebador. El cebador AMP2 fue usado para los productos provenientes del 1erPCR, el cebador SP2 para productos provenientes del PCR-anidado y el cebador SP3 fue usado para todas las muestras independiente si provenía del 1^{er} PCR o PCR-anidado, tal como se muestra en la figura de abajo.

Posición de los cebadores usados para la amplificación y secuenciación del gen *Pfdhfr*

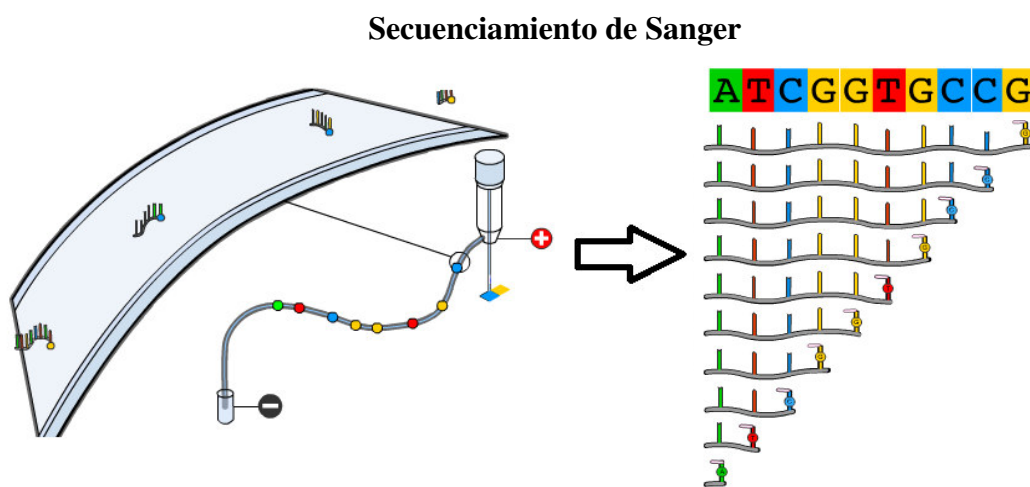


La secuencia de los cebadores y la posición de ellos en el gen se encuentran en el anexo 7. Cada tubo de reacción de secuenciación contuvo al final una alícuota de la pre-mezcla del kit, 1 cebador y una alícuota del producto purificado de amplificación, tal como se describe en el anexo 8. La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador y luego las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta el siguiente paso que fue el de purificación. Como siguiente paso, se purificaron los fragmentos de ADN producto de esta reacción de secuenciación con el fin de retirar los reactivos en exceso y los dímeros de cebadores que se pudieron haber formado durante la reacción. Los productos de amplificación obtenidos fueron purificados en el mismo tubo de reacción de PCR, siguiendo el protocolo de alcohol-acetato-EDTA de Applied Biosystems descrito en el anexo 9. El paso siguiente a la purificación fue el de electroforesis para lo cual el ADN fue reconstituido con Formamida Hi-Di para mantenerlas as hebras separadas y fue cargado en una placa de 96 pocillos.

Como último paso, las muestras de la placa fueron denaturadas incubándolas por 4 minutos a 94°C y puestas inmediatamente en hielo. La placa con los productos de amplificación fue colocada en el equipo de secuenciación 3130xl que fue previamente acondicionado cambiando el buffer de corrida de secuenciación recién diluido (1X). Se usó un arreglo de 16 capilares (LifeTechnology, CA, USA) como medio físico de la migración de los fragmentos de ADN, este se llenó con polímero Pop-7 y se calibró al momento que se instaló en el equipo. El arreglo de capilares tiene una vida media de 100 corridas de muestra por capilar.

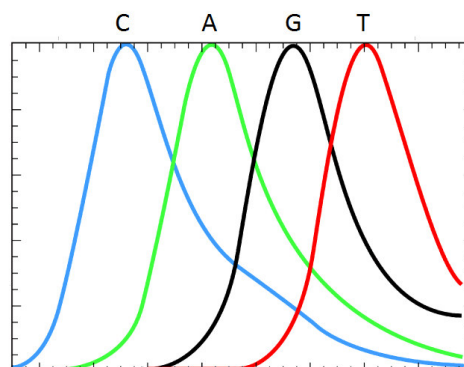
Dentro del equipo de secuenciación, el ADN en cada pocillo de la placa

migró a lo largo del capilar hasta alcanzar la altura del láser, el cual al incidir sobre los fragmentos de ADN produjo la emisión de una señal fluorescente que es captada por el sensor. Estas señales fluorescentes son específicas de cada base nitrogenada marcada por un fluoróculo específico: Big-d110 para citosina (celeste), R6G para adenina (verde), Big-dTAMRA para guanina (amarillo que se evidenció en el software con el color negro) y Big-dROX para timina (rojo), tal como se muestra en la figura de abajo. Las imágenes fueron procesadas y graficadas por el programa del computador Sequencing Analysis v5.2.



Fuente: <http://www.wellcome.ac.uk/Education-resources/Education-and-learning/Resources/Animation/WTDV026689.htm>

Picos de fluorescencia de los nucleótidos durante el análisis



Fuente: https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf

4. Amplificación e identificación de mutaciones en el gen *Pfdhps*

4.1 Amplificación del gen *Pfdhps* (1^{er} PCR)

Se usó un PCR convencional para la amplificación del fragmento interés de 1,326 pb usando los cebadores (M3717 y #186) (anexo 7) y siguiendo las condiciones de amplificación previamente publicados por Wang (82). Es necesario resaltar que se hicieron algunas modificaciones al protocolo publicado por Wang, tanto en el volumen de reacción que fue de 50µL, en las concentraciones de dNTPs y cebadores y en el número de ciclos de amplificación, el procedimiento usado se encuentra en detalle en el anexo 10. El producto de amplificación de este PCR no fue visible en el gel de agarosa debido a su baja concentración (figura no presentada). En todas las reacciones de PCR se usó un control positivo o cepa de referencia y agua destilada en lugar de ADN como un control negativo. El producto de amplificación de este PCR fue usado para proceder con el PCR-RFLP y los PCRs-anidados alelo-específicos como se describe a continuación.

4.2 PCR anidado-RFLP

4.2.1 PCR anidado

Se hizo primeramente un PCR anidado a partir del 1^{er} PCR usando los cebadores #185 y #218 publicados previamente por Wang (anexo 7) y siguiendo las condiciones de amplificación descritas en el anexo 10 (82). Para esto se usó 5 µL del producto del 1^{er} PCR. El producto amplificado del PCR-anidado tuvo un tamaño de 1,151 pb.

4.2.2 Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción

Posteriormente, el producto de amplificación fue digerido (cortado) con dos enzimas de restricción en tubos de reacción separados, tal como fue previamente publicado por Duraisingh (83). La reacción de corte enzimático se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL siguiendo las condiciones e información de la compañía New England Biolabs (MA,USA) (anexo 10). Para la identificación de la mutación

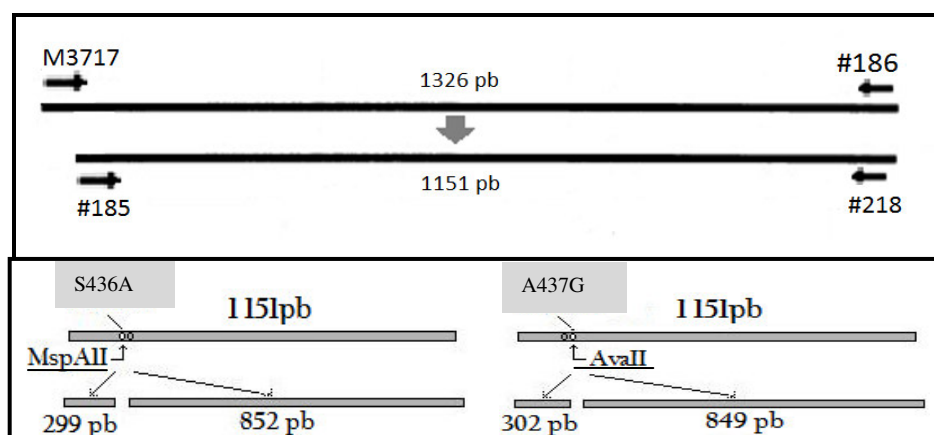
S436A se usó la enzima MspAII, incluyendo en cada grupo de corte a la cepa de referencia D6 con genotipo S436A/A437. Para el caso de la identificación de la mutación A437G se usó la enzima AvaII, incluyendo en cada grupo de corte a la cepa de referencia 3D7 con genotipo S436/A437G, esto se describe a continuación.

Sitios de corte de las enzimas de restricción MspAII y AvaII

Cepa usada	Mutación	Enzima de Restricción	Sitios de restricción	Sitio de restricción en el gen <i>Pfdhps</i>
D6	S436A (TCT>GCT)	MspAII	5'...CMG ∇ CKG...3' 3'...GKC ∇ GMC...5'	...TCCG ∇ CTGCT....
3D7	A437G (GCT>GGT)	AvaII	5'...GGW ∇ CC...3' 3'...CCW ∇ GG...5'TCCTCTG ∇ GT...

La enzima MspAII corta el producto de amplificación en dos fragmentos de 299 pb y 852 pb y la enzima AvaII corta el producto de amplificación en dos fragmentos de 302 pb y 849 pb, tal como se observa en la figura a continuación:

PCR-anidado y RFLP con las enzimas de restricción MSPAII y AvaII



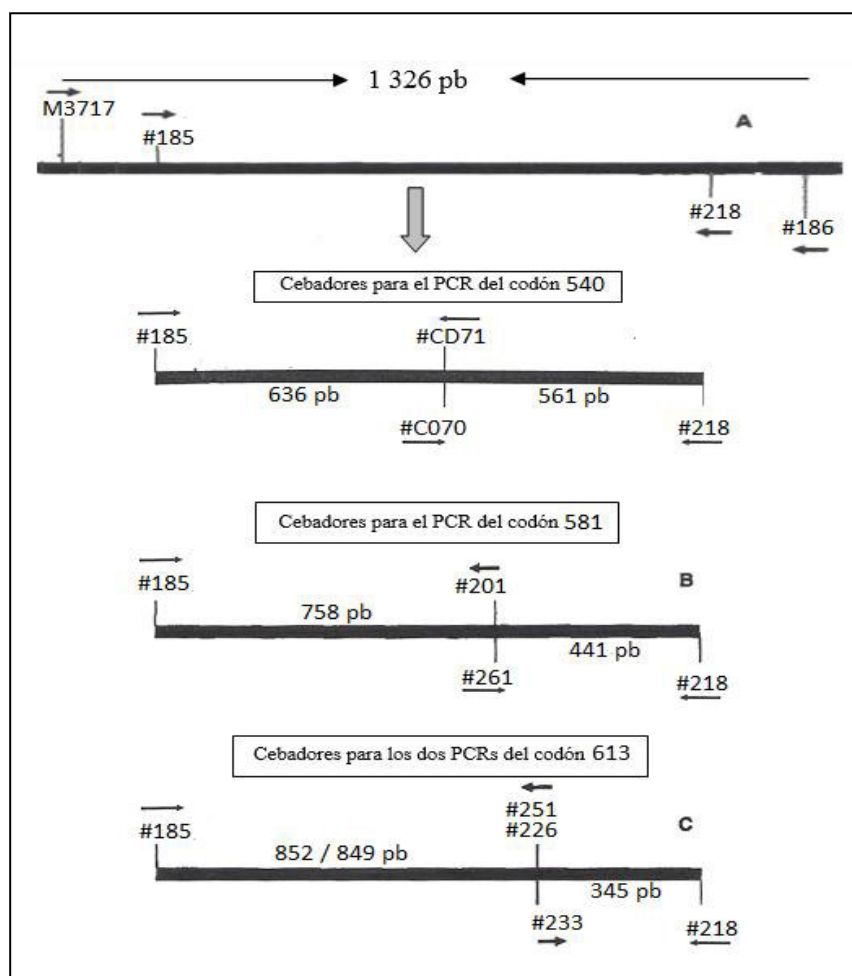
4.3 PCR anidado-alelo específico

Se usó un PCR-multiplex (amplificación de los dos alelos, no-mutante y mutante, en una sola reacción de PCR) para la identificación de cada una de las mutaciones K540E, A581G, A613S y A613T, según los protocolos previamente descritos en la literatura. Los cebadores alelo-específicos usados en los PCRs para la identificación de los alelos del codón 581 y 613 provinieron de la publicación de Wang (82) y los usados para amplificar los alelos del codón 540 provinieron de la publicación de

Shaio (84). Se usaron 4 cebadores para cada uno de los PCRs, un par para amplificar el alelo silvestre y el otro para el alelo mutante (anexo 7).

Para el caso de la mutación K540E, el alelo silvestre (561pb) y mutante (636pb) fueron amplificados usando los pares de cebadores #218/CD70 y #185/CD71 respectivamente. En el caso de la mutación A581G, los cebadores usados para el alelo silvestre (441pb) y mutante (758pb) fueron los cebadores #185/201y #218/#261 respectivamente. Finalmente para amplificar el alelo silvestre (345pb) y los 2 alelos mutantes (849pb) del codón 613 se usaron 2 PCRs, los cebadores #218/#233 y los cebadores #185/#226 para el alelo silvestre y mutante A613S respectivamente, y los cebadores #218/#233 y #185/#251 para el alelo silvestre y mutante A613T. El esquema de amplificación se muestra en la figura a continuación.

Posición de los cebadores usados para el PCR alelo-específico del gen *Pfdhps*



Fuente: Figura modificada de Wang y Shaio (82,84)

Se usó 5 μ L del producto del 1er PCR para cada uno de los PCRs alelo-específico y se siguió el protocolo de amplificación descrito Wang y Shaio (82,84) con algunas modificaciones como se describe en el anexo 11. Además de la presencia de las bandas específicas de cada alelo, se observó en algunas muestras la amplificación de un fragmento de mayor tamaño correspondiente al gen completo (1151pb) producto de los cebadores #185 y #218 (PCR anidado). Las muestras que no amplificaron fueron repetidas en otro PCR usando el doble de cantidad de ADN del 1^{er} producto de amplificación. La secuencia de los cebadores y la posición de todos ellos en el gen se encuentran en el anexo 7.

5. Visualización de los productos de amplificación

Todos los productos de amplificación fueron detectados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% que fue corrida en buffer TAE 1X. Para ello, se tomó 7 μ L de cada muestra a correr y se mezcló con 3 μ L de buffer de carga para ácidos nucleicos y luego se cargó esta mezcla en los pocillos del gel de agarosa. La corrida electroforética fue realizada por 45 minutos a 110V y fueron sumergidos en una solución de bromuro de etidio (1mg/L) durante 15 a 25 min. En cada gel se incluyó un marcador de peso molecular de 100pb o 123 pb, debido a que el rango de los tamaños de los productos de amplificación de corte fue de 299pb a 1151pb. Los geles fueron luego expuestos a radiación UV en una cámara transiluminadora GELDOC2000 y las imágenes fueron documentadas para una posterior edición en el programa Quantity-one del transluminador.

III. RESULTADOS

A. Características clínico-demográficas de los pacientes

Los 65 pacientes con cuadro clínico de MSC provinieron de tres servicios de atención: Medicina (n=43), Obstetricia (n=7) y Pediatría (n=15) del Hospital de Apoyo de Iquitos. La información de edad y parasitemia no estuvo disponible para todos los sujetos, como se muestra en la tabla 2.

Del total de 65 participantes, 60 participantes fueron incluidos en el estudio de caracterización molecular después de la confirmación de mono-infección por *P. falciparum*. El 48% de ellos fueron varones y la media geométrica de la densidad parasitaria fue de 23,783 parásitos/ μ L. No se observaron diferencias en la distribución de las características clínico-demográficas de los participantes (n=60) con respecto a la población total (N=65) (tabla 3).

Comparando la información clínico-demográfica por los tres servicios de atención se encontró que la media geométrica de parasitemia fue mayor en los pacientes del servicio de Medicina (36,927 par/ μ L) que en los servicios de Ginecología y Pediatría (7,000 par/ μ L aprox.), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.032$) (tabla 4). Se observó que el 10% de los casos presentó parasitemias del rango de 333,000 a 1'500,000 par/ μ L (figura 2).

B. Caracterización molecular

1. Determinación de especie de *Plasmodium spp.* por PCR anidado

Como se mencionó líneas arriba, de las 65 muestras incluidas en el estudio 5 fueron infecciones mixtas de *P. falciparum* con *P. vivax*, ya que se evidenciaron en el gel de electroforesis dos bandas de amplificación de 100pb y 200pb correspondientes a cada una de las especies (figura 3 – muestra N°63). Cuatro de estas muestras fueron encontradas en los pacientes provenientes del servicio de Medicina y uno en el servicio de Obstetricia (tabla 4). Las 60 muestras restantes con mono-infección por *P. falciparum* fueron incluidas en el estudio de caracterización molecular.

2. Mutaciones en el gen *Pfdhfr* identificadas por secuenciamiento de ADN

De las seis mutaciones en el gen *Pfdhfr* reportadas en la literatura (codones 16, 50, 51, 59, 108, 164), tres de ellas (N51I, S108N y I164L) fueron reportadas en este estudio de tesis. Asimismo, se observó también la inserción “repetición Bolivia” el cual estuvo presente en todos los aislamientos que presentaron las tres mutaciones. La mutación S108N estuvo en el 100% de las muestras, y las otras dos mutaciones y la inserción BR estuvieron en el 83% de ellas (tabla 5). Los geles de los PCRs correspondientes a las al 1^{er} PCR y PCR-anidado del gen *Pfdhfr* se encuentran en la figura 4.

3. Mutaciones en el gen *Pfdhps* identificadas por PCR-RFLP y PCR-alelo específico

Con respecto al gen *Pfdhps*, de las cinco mutaciones reportadas por la literatura (codones 436, 437, 540, 581 y 613) cuatro fueron observadas en este estudio: S436A, A437G, K540E, A581G. Las mutaciones A437G y A581G fueron las más frecuentes (83%) y la mutación S436A estuvo presente en sólo un aislamiento (tabla 5). La imagen del gel de agarosa correspondiente al PCR-RFLP usado para la identificación de las mutaciones S436A y A437G se encuentra en la figura 5, la correspondiente a las mutaciones K540E y A581G se encuentran en la figura 6, y finalmente la imagen del gel del PCR para las mutaciones A613S y A613T se encuentran en la figura 7.

4. Distribución de genotipos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps*

Con respecto a los genotipos, se identificaron dos genotipos mutantes en el gen *Pfdhfr*: genotipo simple mutante ó 1M (S108N) y cuádruple mutante ó 4M (N51I/S108N/I164L+BR). El genotipo 4M fue el más frecuente y estuvo presente en 50 aislamientos. Para el caso del gen *Pfdhps* se encontraron 4 genotipos: no mutante doble, triple y cuádruple mutante, de ellos el genotipo triple mutante (A437G/K540E/A581G) fue el más frecuente y estuvo presente en 50 de los 65 aislamientos (tabla 6).

Con respecto a los genotipos combinados de *Pfdhfr* y *Pfdhps*, se encontró que el genotipo 7M (4M de *Pfdhfr* y 3M de *Pfdhps*) fue el más frecuente (tabla 6). Este

genotipo estuvo presente en el 77% de los aislamientos (IC95%, 64% - 87%). El anexo 13 muestra la lista total de las 60 muestras y sus genotipos respectivos.

5. Distribución de las mutaciones y genotipos de *Pfdhfr* y *Pfdhps* según el servicio de atención de los participantes.

Finalmente hicimos un análisis de distribución de genotipos según servicios de atención. Se observó una diferencia marginal en la frecuencia de los genotipos del gen *Pfdhps* entre los tres servicios de atención, sin llegar a ser estadísticamente significativa ($p=0.051$).

Sin embargo, se observó diferencia estadísticamente significativa en la distribución del genotipo combinado 7M (*Pfdhfr* / *Pfdhps*) por servicios de atención, 87% en el servicio de medicina, 53% en el servicio de pediatría y 67% en el servicio de obstetricia (valor $p = 0.035$). Posteriormente se hizo una comparación de la frecuencia de sólo este genotipo entre los servicios de atención y observamos que esta diferencia fue estadísticamente significativa, *post hoc* valor $p = 0.020$) (tabla7).

IV. DISCUSION

En el presente estudio se determinaron las frecuencias de mutaciones en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* conocidas por estar asociadas con resistencia al tratamiento combinado sulfadoxina-pirimetamina. Las muestras incluidas en esta tesis provinieron de los casos enrolados de MSC de Iquitos-Loreto, durante los años 1998 y 1999, años en que se reportaron la mayor cantidad de casos fatales por *P. falciparum* en la región Amazónica (15). El análisis de los marcadores moleculares asociados con resistencia en este grupo de muestras fue importante porque permitió documentar información relevante sobre el posible impacto que puede tener la diseminación de cepas resistente de *P. falciparum* en la ocurrencia de casos fatales por malaria en un área endémica.

Casi todas las mutaciones reportadas en esta tesis en los genes *Pfdhfr* (inserción RB, N51I, S108N, I164L) y *Pfdhps* (A437G, K540E y A581G) fueron reportadas previamente en otros estudios en la Selva Amazónica Peruana (74,75,85), aunque con una frecuencia mucho menor (35% - 100% vs 80-100% de esta tesis). La mutación S436A de *Pfdhps* fue reportado por primera vez en este estudio. Estas mutaciones causan en el parásito pérdida de afinidad de la enzima por la droga, por lo que fueron asociadas con resistencia al antimalárico SP; además fueron seleccionándose en las poblaciones endémicas de malaria por *P. falciparum* cuando se usaba SP como primera línea de tratamiento (38,40,60,64,85,86).

Se observó que de todas las mutaciones de *Pfdhfr* la mutación S108N fue la única que estuvo presente en todos los aislamientos, similar a los reportes del mismo periodo de estudio en malaria no complicada (74,75). Esta mutación sería la primera en generarse según Sirawaraporn (87) (ver anexo 12). La presencia de esta mutación ha sido considerada como el mayor mecanismo de resistencia a pirimetamina (55), pues su presencia afecta la afinidad de la droga por la enzima sin afectar su afinidad natural por el sustrato del parásito (88). Su presencia además confiere al parásito adaptabilidad y ventaja durante la transmisión de la enfermedad, más que resistencia por si sola comparada con los otros genotipos, dobles, triples, o cuádruples (52,87).

La progresiva adición de mutaciones en los codones 51 y 164 de *Pfdhfr* gradualmente incrementan la resistencia del parásito a pirimetamina (39,87). La adición de la mutación N51I ha sido seleccionada por el uso de SP en el área Sudamericana,

según observamos los primeros reportes en Bolivia, Perú, Brasil, Colombia and Venezuela que muestran una frecuencia de alrededor de 20-90% (39,74,89–94). Esta mutación no ha sido asociada con resistencia a SP al no observarse una diferencia con respecto al genotipo simple S108N (95).

Finalmente, la mutación I164L, es la última en añadirse según la cascada de resistencia (anexo 12) y está asociado con el más alto grado de resistencia a SP (39,40,87,96). Esta mutación junto con la mutación S108N y N51I formaron el genotipo más frecuente de esta tesis: genotipo cuádruple mutante ó 4M (N51I/S108N/I164L+BR), el cual fue dos veces más frecuente en los casos de MSC de esta tesis comparado con los casos reportados de MNC en la literatura en el departamento de Loreto (74,75) (Tabla 8). Triglia sugiere que este genotipo confiere una mayor adaptabilidad o fitness al parásito bajo presión del antimalárico SP (97), lo que se explica posiblemente por qué observamos una frecuencia del doble en los casos de MSC.

La inserción RB se encontró 100% asociada con la mutación I164L (73). Los ensayos *in vitro* mostraron que esa inserción no añade más resistencia a SP comparado con el genotipo con la mutación I164L, lo que sugiere que posiblemente el uso del antifolato antibacterial trimetoprim fue el que seleccionó a esta mutación (96).

La mutación I164L juntamente con la mutación A16V ha sido asociada con resistencia al antimalárico proguanil (cuyo principio activo es cicloguanil) (98,99). Aunque este antimalárico no forma parte de ningún esquema de tratamiento en nuestro país (anexo 2), es importante resaltar su importancia, ya que proguanil forma parte del tratamiento combinado Proguanil/Atavaquone o “Malarone”, que es usado como tratamiento actual de prevención para viajeros, recomendado por la CDC (100–102) y su modo de acción también es sobre la enzima DHFR (60).

Al igual que S108N en *Pfdhfr*, la mutación A437G en *Pfdhps* sería la primera en aparecer y está relacionada con niveles bajos de resistencia a sulfadoxina (51,59). La segunda mutación en añadirse es la A581G que se asocia a una resistencia *in vitro* moderada a sulfadoxina, y la adición de esta mutación al genotipo simple A437G confiere un incremento en el nivel de resistencia, aunque relativamente pequeño (51,97). El genotipo doble mutante - 2M (A437G/A581G) estuvo presente en sólo el 3% de las muestras y está asociado con un incremento de 1-3 veces de resistencia in

vitro con respecto a la cepa mutante A437G (59). *In vivo* se observa que la adición de esta mutación duplica la probabilidad de producir falla al tratamiento a SP respecto al no mutante (52).

Finalmente, la adición de la mutación K540E al genotipo 2M (ahora genotipo 3M - A437G/K540E/A581G) confiere al parásito el más alto nivel de resistencia a sulfadoxina, duplicándose su probabilidad de falla al tratamiento comparado con el genotipo 2M (52). Éste genotipo fue el doble de frecuente en los aislamientos de MSC de esta tesis comparado con los casos de MNC de referencia publicados (tabla 8) y ha sido encontrado en áreas geográficas que presentan resistencia alta a SP *in vivo* (39).

Por último, se reporta por primera vez en esta región geográfica la presencia de la mutación S436A de *Pfdhps* que fue aislada de un niño de 3 años, esta mutación formó parte del genotipo combinado 8M (4M de *Pfdhfr* y 4M de *Pfdhps*). La mutación S436A ha sido previamente reportada en Kenia, Vietnam y en una comunidad de Brasil (39,89,103). Lamentablemente, al no tener el historial de los viajes del participante no podemos definir a ciencia cierta si este genotipo fue importado de otro país o es que se encuentra en baja frecuencia en la población y fue detectado por el efecto del azar. Esta mutación en conjunto con la A437G no ha sido asociada a resistencia a SP (68). Plowe sugiere que esta mutación es más frecuente en áreas donde no hay mucha presión a SP y que luego disminuye su frecuencia cuando la presión a drogas se incrementa dentro del área geográfica, debido a que los parásitos con esta mutación presentan un reducido fitness con respecto a las cepas no mutantes (39,104,105).

Con respecto al genotipo combinado, en este estudio de tesis se encontró que la frecuencia del genotipo combinado 7M de *Pfdhfr* / *Pfdhps* (genotipo 4M de *Pfdhfr* N51I/S180N/I164L+BR y genotipo 3M de *Pfdhps* A437G/K540E/A581G) estuvo presente en más del 75% de los pacientes infectados con MSC. La frecuencia de este genotipo fue casi el doble de frecuente comparado con los casos de MNC reportados en la literatura (35%), en la misma región y en el mismo espacio de tiempo (73). Debido a la posibilidad de la existencia de sesgo causado por la sobrestimación de la prevalencia de infecciones resistentes dentro de los estudios fármaco-epidemiológicos (65), se eligió el reporte de Salas como referencia para las comparaciones al ser éste un estudio de ensayo clínico y no un estudio de corte transversal como el de Kublin (74) (tabla 8).

El primer reporte de frecuencia de este genotipo combinado en la región Amazónica fue publicado por Kublin y col. en el año 1997, quienes reportaron una frecuencia de 38% de este genotipo en la ciudad de Iquitos (74). El segundo reporte fue de Salas, trabajo de tesis, quien reportó una frecuencia del 35% en dos comunidades de Loreto: Padrecocha y Caballococha a 5 Km y 30 Km de distancia de la ciudad de Iquitos (73); este reporte fue posteriormente publicado en una revista internacional en el año 2009 (52). Ambos estudios fueron reportados en pacientes con MNC y hasta la fecha no hay estudios que hayan sido realizados en pacientes con MSC en esta región. Aunque esta tesis sólo incluyó a los pacientes con MSC de un hospital de la ciudad de Iquitos, es muy posible que estos sean una buena representación de las áreas estudiadas por Salas y Kublin, debido a que los pacientes con sospecha de malaria severa en toda la región de Loreto son en su mayoría derivados a los hospitales de nivel III para una mejor atención.

Los genotipos individuales 4M de *Pfdhfr* y 3M de *Pfdhps*, que conforman el genotipo combinado 7M, han sido asociados con resistencia a SP tanto en estudios de eficacia *in vivo* como *in vitro* (Bacon 2007, Salas tesis) y se han identificado como los últimos en generarse dentro de la cascada de generación de mutaciones en ambos genes (ref) (anexo 13). Las mutaciones I164L de DHFR y K540E de DHPS, que conforman estos genotipos han sido propuestos como predictores de falla al tratamiento a SP, siendo así que están asociados con un 100% de resistencia parasitológica RIII y 97% con resistencia clínica RIII (52).

El segundo genotipo combinado mutante fue el 1M que fue dos veces menos frecuente en los casos de MSC que en los casos de MNC de la publicación de referencia (tabla 8). El tercer genotipo combinado mutante fue el 6M, presente en sólo 2 aislamientos, el cual a diferencia del 7M no presentó la mutación en el codón 540 de *Pfdhps*. Este genotipo, aunque en menor magnitud también ha sido asociado con falla clínica ($p<0.01$), con un 22% de casos con resistencia parasitología RIII, 33% a RII y 33% a SP sensible (52,73). Finalmente el cuarto genotipo combinado fue el 1M (*Pfdhfr* S108N + genotipo silvestre de *Pfdhps*), que fue 3 veces menos frecuente comparado con los reportes de MNC reportados por Salas (tabla 8). Este genotipo ha sido asociada con resistencia leve *in vitro*, resistencia leve (RI) en estudios *in vivo* y sensibilidad a pirimetamina (39,52,74).

Debido a la acción sinérgica de pirimetamina sobre sulfadoxina (64), razón por la que el tratamiento recomendado es combinado (Scott y col., 1987), la mutación A437G se encuentra asociada casi siempre con al menos una mutación en *Pfdhfr* (51). Por lo que generalmente la selección de mutaciones múltiples en *Pfdhps* casi siempre van acompañadas de selección de mutaciones múltiples en *Pfdhfr* (Wang, Read et al. 1997), siendo las mutaciones en *Pfdhfr* las que se seleccionan primero que las mutaciones de *Pfdhps* (59,60). Sin embargo, en esta tesis hubieron 2 aislamientos con genotipo combinado 4M que no compartieron estas características: 1 muestra con genotipo 4M de *Pfdhfr* + no mutante de *Pfdhps* y una muestra con genotipo 1M de *Pfdhfr* + 3M de *Pfdhps*.

El hecho de que se haya encontrado estos genotipos en este estudio y no en los de Salas y Kublin, podría deberse a la posibilidad de que los casos de MSC incluyeron casos de áreas remotas que fueron derivados a la ciudad de Iquitos. Por otro lado, es posible que haya habido una expansión clonal del parásito asociado con el incremento de los casos (16), aumentando las probabilidades de tener nuevas combinaciones de genotipos (recombinación o *crossing over*) y seleccionándose como respuesta a exposiciones previas a sulfadoxina como parte de los tratamientos para infecciones respiratorias o gastrointestinales (60). Hjar y col. encontraron una alta diversidad en las cepas circulantes en Iquitos durante el año 1998 (106).

Debido a la baja probabilidad de selección de mutantes *Pfdhps* sin selección previa de mutantes *Pfdhfr* (menor fitness del parásito) (60), sugerimos que el segundo genotipo (1M *Pfdhfr* + 4M *Pfdhps*) pudo originarse con mayor probabilidad por recombinación que por selección de la cepa mutante *per se*. Lamentablemente no se puede verificar estas hipótesis, debido a que no se cuenta con información sobre marcadores neutrales (marcadores que no están sujetos a selección) en este grupo de muestras.

La dispersión de resistencia a los antimaláricos en uso y el fenómeno natural del Niño en la región Amazónica fueron los principales factores asociados con la epidemia de malaria en el año 1998 (7,107). La severidad y patología de la malaria está estrechamente relacionada con los factores que favorecen la proliferación del parásito (alta parasitemia), la cual se puede controlar y evitar si se administra un tratamiento adecuado (16). Sin embargo, esto no se cumplió en Loreto debido a que se tenían como

antecedente a la dispersión de resistencia al antimalárico en uso, CQ primeramente y luego SP. Un reporte sobre un brote de malaria por *P. falciparum* en África, encontró que el incremento de mortalidad por malaria estuvo asociado de una manera importante con la dispersión de resistencia al antimalárico en uso en la población, en ese caso CQ (108), esto se corrobora con el hallazgo de Wichman en Gana, donde los niños que presentaron más complicaciones por malaria tuvieron mayor concentración de CQ en sangre, posiblemente debido a que recibieron un exceso de tratamiento previo producto de una no-eficacia del tratamiento, esto en un área con presencia del genotipo resistente 76K de *Pfcr* en más del 80% que confiere resistencia a CQ (109) .

Un hallazgo importante en este estudio fue que el 75% de los aislamientos de los casos de MSC presentaron el genotipo mutante asociado con resistencia alta a SP, esto dentro de un área donde este genotipo se encontraba en menos del 40% de las cepas circulantes totales (75). Este hallazgo corrobora lo que White describe *“el incremento de morbilidad y mortalidad no se debe al tratamiento inadecuado de malaria severa sino al tratamiento inadecuado oral de primera-línea que causa un incremento en la proporción de pacientes que desarrollan malaria severa”* (25). Esto sugiere que en los pacientes con MSC el tratamiento de 1era línea posiblemente produjo la selección preferente de cepas resistentes a SP, siendo así un factor de riesgo importante para la ocurrencia de MSC (64,86,110).

El hallazgo de una mayor frecuencia de parásitos resistentes en estos pacientes, muestra que los parásitos con este genotipo resistieron las dosis de tratamiento que recibió el paciente por un tiempo mayor que los parásitos con el genotipo sensible o moderadamente sensible (1M), que según Hastings sería un mínimo de 5 días, cuando la concentración de droga es menor a la óptima para la eliminación de este tipo de parásitos (111). Esto se corrobora también con el reporte de Hajar en Loreto, donde la diversidad genética del gen GLURP de los aislamientos de los casos con MSC fue menor que en los casos de MNC, producto de una selección de estos parásitos por presión a droga (112). Asimismo, Ogotu encontró una mayor frecuencia del genotipo múltiple mutante en el día que los pacientes presentaron recurrencia de parasitemia comparado con el día de primo-infección, pudiendo incrementar su riesgo de desarrollar malaria severa (113), que para el caso de SP esta selección de parásitos mutantes suele ser muy rápido, incluso desde el punto de vista poblacional (114).

Sin embargo, estos antecedentes no explican la presencia de los 9 casos de MSC que tuvieron el genotipo combinado 1M (S108N), quienes según los reportes de eficacia a antimaláricos realizados en la misma área geográfica, debieron haber respondido fácilmente al tratamiento con SP o tener RI (52,73,74,96) y por ende deberían tener menos riesgo de desarrollar el cuadro clínico de severidad. Entonces es posible que otros factores como los del hospedero pueden haber afectado a la respuesta al tratamiento (115). Por otro lado, debido a la falta de información del caso clínico, no podemos descartar la posibilidad de que ellos hayan recibido CQ y no SP como tratamiento de primera línea, ya que para esa época en algunos lugares de la Amazonía CQ era la primera línea de tratamiento y SP la segunda línea (116), debido a que ésta no se había implementado por razones logísticas sumado a las altas tasas de abandono al tratamiento (7,13,117). Si ese fuera el caso, un reporte previo mostró que el 100% de las muestras de esta tesis contenían a la mutación K72T del gen *Pfcr*t (datos no publicados, comunicación personal con Carmen Lucas – NAMRU-6), por lo que la probabilidad de falla a CQ era alta en esa población (118).

Además del tratamiento recibido, la severidad de la enfermedad está influenciada por otros factores como: dosis sub-óptimas, estatus nutricional, respuesta inmune del paciente, edad, metabolismo de la droga en el paciente, entre otros (16,25,60,119), por lo que la respuesta al tratamiento per se no explica solamente por el perfil genético del parásito (39,120). Este estudio incluyó a pacientes que fueron atendidos en tres servicios de atención: medicina, pediatría y obstetricia. La distribución de características clínico-demográficas fue relativamente homogénea entre los tres servicios de atención.

Sin embargo, se observó que la media geométrica de parasitemia en los adultos (adultos varones y mujeres adultas no gestantes) fue de 6 veces respecto a la de los niños y gestantes, posiblemente debido a que los adultos al tener altos niveles de inmunidad parcial adquirida presentaron una malaria no complicada relativamente estable (1), pudiendo soportar altos niveles de parasitemia que no siempre es acompañado por malaria clínica (121). Por otro lado, debido al hecho que se considera como emergencia médica un caso de malaria en gestantes, es posible que el tiempo de atención en el diagnóstico y tratamiento (artesunato u otros) en este grupo de pacientes haya sido más rápido comparados con los adultos no gestantes (122).

Cabe resaltar además, que las parasitemias altas fueron observadas en los pacientes provenientes del servicio de medicina, llegando a reportarse los valores de 640,000 y 1'500,000 parásitos por μL de sangre en dos muestras de pacientes. El valor de 1 millón de parásitos no pudo verificarse debido a que estos datos fueron colectados en el año 1998, por lo que se recomienda considerarlo con cautela, pues estos valores sólo son reportados en casos de MSC de África. El paciente que tuvo más de 1 millón de parásitos por μL de sangre fue un adulto que murió por malaria cerebral luego de ser internado en el Hospital (comunicación personal con el Investigador Principal). Es importante mencionar que la medida de parasitemia es relativa ya que estará influenciada por el nivel de secuestro de parásitos en los capilares y no siempre es exacta o una buena medida de cantidad de parásitos (110).

Con respecto a los marcadores moleculares de resistencia por servicios de atención, se encontró que el genotipo combinado mutante 7M fue menos frecuente en los niños y en las mujeres del servicio de obstetricia, comparado con los pacientes del servicio de medicina. Sugiriendo que una menor inmunidad en niños (menor exposición previa a malaria) y mujeres embarazadas también es un factor importante para la falla al tratamiento, como lo muestra un estudio en Nigeria donde los niños menores de 5 años presentaron mayor riesgo de fallar al tratamiento independiente del genotipo mutante del parásito infectante (123). Además, dentro del grupo de gestantes, las mujeres con poca o sin inmunidad pueden sufrir complicaciones que son muchas veces fatales (121). Adicionalmente, la farmacocinética de los antimaláricos es diferente en este grupo de pacientes y por ende se afecta la respuesta al tratamiento y el control de la parasitemia (16,124), teniendo mayor riesgo de desarrollar una malaria severa debido a un tratamiento ineficaz que debido a la resistencia del parásito (125).

El presente estudio aportó información sobre el patrón molecular de resistencia en los genes *Pf dhfr* y *Pf dhps* involucrados con el antimalárico SP o Fansidar (Roche, Suiza) en muestras de pacientes con malaria severa y/o complicada del departamento de Loreto colectadas en el año 1998. Hasta el momento este es el primer estudio de este tipo, que evalúa la asociación de marcadores moleculares de resistencia en casos de MSC en un área donde la resistencia al antimalárico evaluado estaba difundida. Existen hasta el momento 4 estudios que mostraron la caracterización molecular del parásito en casos de MSC, aunque en escenarios muy diferentes de la tesis aquí presentada.

El primero es Ibrahim quien encontró una asociación entre la presencia del genotipo mutante simple (S108N) de *Pf dhfr* como factor de riesgo para anemia por malaria severa en Nigeria-África, sin embargo este estudio fue desarrollado en un área la dispersión de resistencia a SP no era alta, considerando que el genotipo mutante S108N no está asociado con una resistencia alta comparada a los genotipos con más de 2 mutaciones (126). El segundo reporte es de Montoya, quien evaluó la relación de dos mutaciones del gen *Pf mdr1* con falla al tratamiento de CQ, MQ y amodiaquina (AQ) tanto en casos de MSC y MNC; para este caso la resistencia a MQ y AQ no está difundida y los marcadores moleculares asociados con resistencia no han sido bien caracterizados, y además la mutación clave para evaluar resistencia a CQ no fue evaluada en este estudio (33). El tercer reporte es de Bob y col quienes reportaron una mayor frecuencia (no tan alta) del genotipo mutante de *Pf dhfr* en pacientes con malaria cerebral / malaria hospitalizada en Senegal- África, sin embargo a diferencia de esta tesis, Bob y col. hicieron su estudio en un área donde SP ya no era parte del programa de antimalárico aunque si con una alta proporción de auto-tratamiento fuera del centro de salud (127). Finalmente, el cuarto estudio reportó una mayor frecuencia (10% de diferencia) de la mutación 76K de *Pf crt* asociado con resistencia a CQ en casos de MSC respecto a casos de MNC, la frecuencia de esta mutación en la población de MNC en Mali - África fue de 60% (128).

Durante el periodo de estudio (1998) el Perú reportó la mayor cantidad de casos de malaria en su historia, y los casos de MSC también fueron considerablemente altos. La severidad del cuadro clínico de MSC en el paciente, lleva en la mayoría de los casos a una muerte rápida, lo cual hace difícil su estudio. En ese entonces, el tratamiento en uso era SP y la dispersión de la resistencia a este tratamiento se consideró como uno de los factores asociados con el incremento de casos de malaria. Desde el 2001 se ha reemplazado el tratamiento a uno combinado de artesunato-mefloquina, debido a la dispersión de resistencia a SP. Si bien es cierto ahora no tenemos casos severos en la misma magnitud que en 1998, este estudio evidenció que la dispersión de la resistencia a drogas en la población es un determinante importante para el manejo de los casos de MSC en una región endémica de malaria.

LIMITACIONES

En primer lugar al ser este un estudio transversal, los hallazgos encontrados no pudieron ser comparados con un grupo control dentro de la misma población, por lo que es posible que la frecuencia de mutaciones sea menor a la real (error tipo I). Sin embargo al comparar los resultados con el reporte de dos localidades muy distantes, podríamos sugerir que la frecuencia de mutaciones en el grupo de comparación sería cercana a la real, más aún la frecuencia de mutaciones en la comunidad de Caballococha fue mucho mayor que la de Padrecocha, cabiendo la posibilidad de incluso subestimar la diferencia encontrada. Asimismo, por norma del Ministerio de Salud, todos los casos confirmados o sospechosos de malaria severa detectados en los centros de salud tuvieron que ser derivados a los hospitales de nivel III para atención de hospitalización, por lo que es posible que este grupo de muestras haya sido una buena representación de los casos de MSC de la región.

Segundo, debido a que la información de esta investigación provino de un estudio realizado hace más de 10 años, no se tuvo la facilidad de verificar y completar algunos datos de parasitemia, edad y lugar de posible infección de los casos, ni tampoco los datos epidemiológicos exactos de ese periodo de estudio.

Tercero, al no haber un estudio de análisis de marcadores neutrales de diversidad, no fue posible explicar los nuevos genotipos observados en este grupo de muestras. Finalmente, hubiera sido conveniente incluir la información de inmunidad de los pacientes, para ajustar las conclusiones encontradas por los posibles confusores de inmunidad del paciente.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El genotipo 7M (N51I/S180N/I164L+BR de *Pf dhfr* y A437G/K540E/A581G de *Pf dhps*), previamente asociado con resistencia a sulfadoxina/pirimetamina, fue encontrado en un 75% de las muestras de malaria severa y/o complicada de esta tesis. Esto corrobora el hallazgo epidemiológico de la importancia de la resistencia al tratamiento de primera línea como factor determinante en la ocurrencia de casos MSC. Estos hallazgos proponen la necesidad de incluir dentro de la vigilancia de malaria a los marcadores moleculares de resistencia, especialmente cuando se observe un incremento desmedido de casos o durante un brote.
2. Por otro lado, la diferencia de la frecuencia del genotipo combinado 7M observada entre los diferentes servicios de atención, muestra que el factor genético del parásito no es el único importante. Siendo así que los pacientes del servicio de obstetricia y pediatría presentaron menor porcentaje de infección con cepas altamente resistentes, sugiriendo que otros factores también son importante en este grupo de pacientes. Sería necesario validar los hallazgos de este estudio en regiones con distintos índices de endemicidad.
3. Se sugiere además replicar este estudio en otras regiones donde aún usen SP o sus análogos como primera línea de tratamiento.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2002;15(4):564–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364370>
2. Moyes CL, Henry AJ, Golding N, Huang Z, Singh B, Baird JK, et al. Defining the geographical range of the *Plasmodium knowlesi* reservoir. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014;8(3):e2780. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676231>
3. Calderón G, Fernández R, Valle J. Especies de la fauna anofelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Perú. *Rev Peru Epidemiol*. 1995;8:5–23.
4. Flores-Mendoza C, Fernandez R, Escobedo-Vargas KS, Vela-Perez Q, Schoeler GB. Natural *Plasmodium* infections in *Anopheles darlingi* and *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) from eastern Peru. *J Med Entomol* [Internet]. 2004;41(3):489–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15185955>
5. Reinbold-Wasson DD, Sardelis MR, Jones JW, Watts DM, Fernandez R, Carbajal F, et al. Determinants of *Anopheles* seasonal distribution patterns across a forest to periurban gradient near Iquitos, Peru. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2012;86(3):459–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22403317>
6. Aramburu J, Ramal C, Witzig RS. Malaria Reemergence in the Peruvian Amazon Region. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(2):209–15.
7. Neyra D, Cabezas C, Ruebush 2nd TK. El proceso de adecuación y cambio en la política del tratamiento de la malaria por *Plasmodium falciparum* en el Perú, 1999-2001. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2003;20(3).
8. Ruebush 2nd TK, Neyra D, Cabezas C. Modifying national malaria treatment policies in Peru. *J Public Heal Policy* [Internet]. 2004;25(3-4):328–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15683069>
9. WHO. World Malaria Report 2014 [Internet]. Global Malaria Programme - World Health Organization; 2014. Available from: http://who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/
10. MINSA. Boletín Epidemiológico Semanal N°53. Boletín Epidemiológico. Perú: Dirección General de Epidemiología, Red Nacional de Epidemiología - Ministerio de Salud; 2014.
11. MINSA. Sala Situacional 2014. Sala Situacional. Perú: Dirección General de Epidemiología - Ministerio de Salud; 2014.
12. MINSA-USAID. Impacto Económico de la Malaria en el Perú [Internet]. Serie Vigía. Dirección General de Salud de las Personas - Ministerio de Salud; 1999. Available from: http://www.minsa.gob.pe/pvigia/publicaciones/malaria_y_otras_enfermedades/malaria/7impacto_economico_malaria.pdf
13. Cálderón L, Valencia W, Albujar J. Análisis de la epidemia de malaria en la zona del Alto Pastaza región Loreto (1989-1996). *Rev peru epidemiol*. 1996;9(2).

14. Griffing SM, Gamboa D, Udhayakumar V. The history of 20th century malaria control in Peru. *Malar J* [Internet]. 2013;12:303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24001096>
15. Vargas J. Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. *Rev Peru Epidemiol*. 2003;11(1).
16. MINSA-USAID. Factores de riesgo de la malaria grave en el Perú. Serie Vigía. Lima-Perú: Programa de Control de Malaria y Otras Enfermedades Metaxenicas - Dirección General de Salud de las Personas - Ministerio de Salud; 2001.
17. Delfino R, Santos-Filho O, Figueroa-Villar J. Type 2 Antifolates in the Chemotherapy of falciparum Malaria. *J Braz Chem Soc*. 2002;13(6):727–41.
18. Celis J, Montenegro R, Castillo A, Ché E, Muñoz A. Evolución de la malaria en la región Loreto. *An Fac Med UNMSM*. 2003;64(4):261–6.
19. WHO. Managment of severe malaria: a practical handbook. - 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2012.
20. Muller M, Schlagenhauf P. Plasmodium knowlesi in travellers, update 2014. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2014;22:55–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631521>
21. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Crit Care* [Internet]. 2003;7(4):315–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12930555>
22. White NJ. The treatment of malaria. *N Engl J Med* [Internet]. 1996;335(11):800–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8703186>
23. Bardales F. Manejo en UCI de la malaria falciparum severa complicada. *Bol la Soc Peru Med Interna*. 2000;13(1).
24. WHO. Guidelines for the treatment for malaria. World Health Organization; 2006.
25. White N. Antimalarial drug resistance and mortality in falciparum malaria. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 1999;4(7):469–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10470336>
26. Kahigwa E, Schellenberg D, Sanz S, Aponte JJ, Wigayi J, Mshinda H, et al. Risk factors for presentation to hospital with severe anaemia in Tanzanian children: a case-control study. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2002;7(10):823–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358616>
27. Durand S, Ramal C, Huilca M, Cabezas C. Oportunidad en el diagnóstico y tratamiento de la malaria en comunidades periurbanas de la Amazonía Peruana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2005;22(1):7.
28. Barcus MJ, Basri H, Picarima H, Manyakori C, Sekartuti, Elyazar I, et al. Demographic risk factors for severe and fatal vivax and falciparum malaria among hospital admissions in northeastern Indonesian Papua. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2007;77(5):984–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984364>
29. MINSA. RM No. 116-2015 MINSA/DGSP-V.01 Norma técnica de salud para la atención de la malaria y malaria grave en el Peru. Salud M de, editor. Perú:

Dirección General de Salud de las Personas - Ministerio de Salud; 2007 modificado. 2015.

30. MINSA. NT No. 2005-MINSA/DGSP-V.01 Norma técnica para la atención curativa de la malaria - Esquemas terapéuticos en el tratamiento de la malaria no complicada y malaria grave en el Perú. Salud M de, editor. Perú: Dirección General de Salud de las Personas - Ministerio de Salud; 2005.
31. Schwartz E, Sadetzki S, Murad H, Raveh D. Age as a risk factor for severe *Plasmodium falciparum* malaria in nonimmune patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2001;33(10):1774–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641827>
32. Phillips A, Bassett P, Zeki S, Newman S, Pasvol G. Risk factors for severe disease in adults with *falciparum* malaria. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009;48(7):871–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19243243>
33. Montoya P, Tobon A, Blair S, Carmona J, Maestre A. Polimorfismos del gen *Pfmdr1* en muestras clínicas de *Plasmodium falciparum* y su relación con la respuesta terapéutica a antipalúdicos y paludismo grave en Colombia. *Biomédica*. 2007;27:12.
34. Farooq U, Dubey ML, Shrivastava SK, Mahajan RC. Genetic polymorphism in *Plasmodium falciparum*: differentiation of parasite isolates of high & low virulence by RAPD. *Indian J Med Res* [Internet]. 2012;136(2):292–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960898>
35. Tobon A, Piñeiros JG, Blair S, Carmona-Ponseca J. Clínica de la malaria complicada debida a *P. falciparum*. Estudio de casos y controles en Tumaco y Turbo (Colombia). *IATREIA*. 2006;19(4).
36. Sowunmi A, Fateye BA, Adedeji AA, Gbotosho GO, Happi TC, Bamgboye AE, et al. Predictors of the failure of treatment with pyrimethamine-sulfadoxine in children with uncomplicated *falciparum* malaria. *Acta Trop* [Internet]. 2006;98(1):6–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16513078>
37. Bloland PB, WHO, Organization WH. Drug resistance in malaria. *Malaria Epidemiology Branch, CDC*; 2001.
38. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2002;2(4):209–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937421>
39. Plowe C V, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis* [Internet]. 1997;176(6):1590–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395372>
40. Plowe C V. Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *J Exp Biol* [Internet]. 2003;206(Pt 21):3745–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506209>
41. Chauca H, Quintana J. Evaluación in vivo de la respuesta de *Plasmodium falciparum* a la cloroquina en foco carretera Yurimaguas-Tarapoto (Región Loreto). *Rev Peru Epidemiol*. 1993; 6:34–9.

42. Magill AJ, Zegarra J, Garcia C, Marquino W, Ruebush 2nd TK. Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Amazon basin of Peru. *Rev da Soc Bras Med Trop*. 2004;37(3):279.
43. Marquino W, MacArthur JR, Barat LM, Oblitas FE, Arrunategui M, Garavito G, et al. Efficacy of chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria on the north coast of Peru. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2003;68(1):120–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12557836>
44. Marquino W, Ylquimiche L, Hermenegildo Y, Palacios AM, Falconi E, Cabezas C, et al. Efficacy and tolerability of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine and sulfadoxine-pyrimethamine alone for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2005;72(5):568–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15891131>
45. Williams HA, Vincent-Mark A, Herrera Y, Chang OJ. A retrospective analysis of the change in anti-malarial treatment policy: Peru. *Malar J* [Internet]. 2009;8:85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400953>
46. De Oliveira AM, Chavez J, de Leon GP, Durand S, Arrospide N, Roberts J, et al. Efficacy and effectiveness of mefloquine and artesunate combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2011;85(3):573–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896825>
47. Basco LK, WHO, Organization WH. Field application on in vivo assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarials drugs. *Global Malaria Programme, World Health Organization*; 2007.
48. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2004;17(1):235–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726463>
49. Sibley CH. Understanding drug resistance in malaria parasites: basic science for public health. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 2014;195(2):107–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24927641>
50. Bacon DJ, Jambou R, Fandeur T, Le Bras J, Wongsrichanalai C, Fukuda MM, et al. World Antimalarial Resistance Network (WARN) II: in vitro antimalarial drug susceptibility. *Malar J* [Internet]. 2007;6:120. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822533>
51. Triglia T, Menting JG, Wilson C, Cowman AF. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997;94(25):13944–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9391132>
52. Bacon DJ, Tang D, Salas C, Roncal N, Lucas C, Gerena L, et al. Effects of point mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes on clinical outcomes and in vitro susceptibility to sulfadoxine and pyrimethamine. *PLoS One* [Internet]. 2009;4(8):e6762. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707564>

53. Peterson DS, Di Santi SM, Pova M, Calvosa VS, Do Rosario VE, Wellems TE. Prevalence of the dihydrofolate reductase Asn-108 mutation as the basis for pyrimethamine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1991;45(4):492–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1951858>
54. Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988;85(23):9109–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3057499>
55. Peterson DS, Walliker D, Wellems TE. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988;85(23):9114–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2904149>
56. Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem* [Internet]. 1994;224(2):397–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7925353>
57. Triglia T, Cowman AF. Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994;91(15):7149–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8041761>
58. Aurrecochea C, Brestelli J, Brunk BP, Dommer J, Fischer S, Gajria B, et al. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2015 Apr 13];37(Database):D539–43. Available from: http://nar.oxfordjournals.org/content/37/suppl_1/D539.long
59. Wang P, Read M, Sims PF, Hyde JE. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol* [Internet]. 1997;23(5):979–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9076734>
60. Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe C V, Kublin JG, Mberu EK, et al. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol* [Internet]. 2001;17(12):582–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756042>
61. Ferone R. Folate metabolism in malaria. *Bull World Heal Organ* [Internet]. 1977;55(2-3):291–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/338184>
62. Wang P, Wang Q, Aspinall T V, Sims PF, Hyde JE. Transfection studies to explore essential folate metabolism and antifolate drug synergy in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* [Internet]. 2004;51(5):1425–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982635>
63. Mishra R, Mishra B, Narayana-Moorthy H. Dihydrofolate reductase enzyme: a potent target for antimalarial research. *Asian J Cell Biol*. 2006;1(1):11.

64. White N. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci* [Internet]. 1999;354(1384):739–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10365399>
65. Watkins WM, Mberu EK, Winstanley PA, Plowe C V. The efficacy of antifolate antimalarial combinations in Africa: a predictive model based on pharmacodynamic and pharmacokinetic analyses. *Parasitol Today* [Internet]. 1997;13(12):459–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275132>
66. Khan B, Omar S, Kanyara JN, Warren-Perry M, Nyalwidhe J, Peterson DS, et al. Antifolate drug resistance and point mutations in *Plasmodium falciparum* in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1997;91(4):456–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9373654>
67. Basco LK, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon I. Analysis of point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1998;58(3):369–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546421>
68. Basco LK, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon II. Baseline frequency of point mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1998;58(3):374–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546422>
69. Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, et al. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* [Internet]. 2002;185(3):380–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807721>
70. Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* [Internet]. 2000;15(1):7–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612815>
71. Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley J. *Introduction to Genetic Analysis*. 10th editi. New York: W. H. Freeman and Company; 2012. 809 p.
72. Plowe C V. Antimalarial chemotherapy. In: Philip J. Rosenthal, editor. 2001. p. 409.
73. Carola J. Salas Hermoza. Marcadores moleculares asociados a *Plasmodium falciparum* resistente a sulfadoxina-pirimetamina en las localidades de Caballococha y Padre Cocha, región Loreto, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
74. Kublin JG, Witzig RS, Shankar AH, Zurita JQ, Gilman RH, Guarda JA, et al. Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria. *Lancet* [Internet]. 1998;351(9116):1629–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620719>
75. Bacon DJ, McCollum AM, Griffing SM, Salas C, Soberon V, Santolalla M, et al. Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2009;53(5):2042–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19258269>
76. Schay G. *The Central Limit Theorem. Introduction to probability with statistical applications*. Boston; 2007.

77. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1993;61(2):315–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8264734
78. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1993;58(2):283–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8479452>
79. Snounou G, Balbir S. Nested PCR Analysis of *Plasmodium*. In: Doolan DL, editor. *Malaria Methods and Protocols : Methods and Protocols*. 2002.
80. Plowe C V, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1995;52(6):565–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7611566>
81. Gyang FN, Peterson DS, Wellems TE. *Plasmodium falciparum*: Rapid detection of dihydrofolate reductase mutations that confer resistance to cycloguanil and pyrimethamine. *Exp Parasitol*. 1992;74(4):470–2.
82. Wang P, Brooks DR, Sims PF, Hyde JE. A mutation-specific PCR system to detect sequence variation in the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1995;71(1):115–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7630375>
83. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. *Exp Parasitol* [Internet]. 1998;89(1):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603482>
84. Shaio MF, Wang P, Lee CS, Sims PF, Hyde JE. Development and comparison of quantitative assays for the dihydropteroate synthetase codon 540 mutation associated with sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* [Internet]. 1998;116 (Pt 3):203–10. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9550212
85. Cortese JF, Caraballo A, Contreras CE, Plowe C V. Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. *J Infect Dis* [Internet]. 2002;186(7):999–1006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12232841>
86. Diourte Y, Djimde A, Doumbo OK, Sagara I, Coulibaly Y, Dicko A, et al. Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in Mali. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1999;60(3):475–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10466980>
87. Sirawaraporn W, Sathitkul T, Sirawaraporn R, Yuthavong Y, Santi D V. Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A [Internet]. 1997;94(4):1124–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9037017>
88. Le Bras J, Durand R. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* [Internet]. 2003;17(2):147–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667224>
 89. Vasconcelos KF, Plowe C V, Fontes CJ, Kyle D, Wirth DF, Pereira da Silva LH, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2000;95(5):721–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998224>
 90. Urdaneta L, Plowe C, Goldman I, Lal AA. Point mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1999;61(3):457–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497990>
 91. Contreras CE, Cortese JF, Caraballo A, Plowe C V. Genetics of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in the Venezuelan state of Bolivar. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2002;67(4):400–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12452494>
 92. Schmider N, Peyerl-Hoffmann G, Restrepo M, Jelinek T. Short communication: point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2003;8(2):129–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581437>
 93. McCollum AM, Mueller K, Villegas L, Udhayakumar V, Escalante AA. Common origin and fixation of *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in a low-transmission area in South America. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007;51(6):2085–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283199>
 94. Mita T, Tanabe K, Kita K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int* [Internet]. 2009;58(3):201–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393762>
 95. Nzila-Mounda A, Mberu EK, Sibley CH, Plowe C V, Winstanley PA, Watkins WM. Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorcycloguanil activity in vitro and point mutations in the dihydrofolate reductase domain. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1998;42(1):164–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9449279>
 96. Cortese JF, Plowe C V. Antifolate resistance due to new and known *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutations expressed in yeast. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1998;94(2):205–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9747971>
 97. Triglia T, Wang P, Sims PF, Hyde JE, Cowman AF. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *EMBO J* [Internet]. 1998;17(14):3807–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9669998>

98. Foote SJ, Galatis D, Cowman AF. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1990;87(8):3014–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2183221>
99. Peterson DS, Milhous WK, Wellems TE. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1990;87(8):3018–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2183222>
100. CDC. Medicines for the prevention of malaria while traveling Atovaquone-Proguanil (Malarone™) [Internet]. Health C for DC and P-C for G, editor. 2015 [cited 2015 May 20]. Available from: <http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/drugs/atovaquoneproguanil.pdf>
101. Cowman AF, Duraisingh MT. An old enemy, a new battle plan. Perspective on combating drug-resistant malaria. *EMBO Rep* [Internet]. 2001;2(2):77–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11258713>
102. Llanos-Cuentas A, Campos P, Clendenes M, Canfield CJ, Hutchinson DB. Atovaquone and proguanil hydrochloride compared with chloroquine or pyrimethamine/sulfadoxine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Peru. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2001;5(2):67–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11493411>
103. Wang P, Lee CS, Bayoumi R, Djimde A, Doumbo O, Swedberg G, et al. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1997;89(2):161–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364963>
104. Anderson TJ, Roper C. The origins and spread of antimalarial drug resistance: lessons for policy makers. *Acta Trop* [Internet]. 2005;94(3):269–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878153>
105. Plowe C V. The evolution of drug-resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2009;103 Suppl :S11–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084883>
106. Hajar G, Padilla C, Marquino W, Falconi E, Montoya Y. Genetic polymorphism of *Plasmodium falciparum* isolates from Loreto, Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2002;96 Suppl 1:S137–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055827>
107. Sanabria H. Panorama epidemiológico de los desastres naturales. Ensayo a propósito del fenómeno El Niño en el Perú (1998). *Rev Med Exp INS*. 1998;15(1):8.
108. Marsh K. Malaria disaster in Africa. *Lancet* [Internet]. 1998;352(9132):924. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9752813>
109. Wichmann O, Eggelte TA, Gellert S, Osman ME, Mylius F, Ehrhardt S, et al. High residual chloroquine blood levels in African children with severe malaria seeking healthcare. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2007;101(7):637–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467758>

110. WHO. Management of severe malaria: a practical handbook. - 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2000.
111. Hastings IM, Watkins WM, White NJ. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002;357(1420):505–19.
112. Hajar G, Quino H, Padilla C, Montoya Y. Variabilidad genética de *Plasmodium falciparum* en pacientes con malaria grave y malaria no complicada en Iquitos - Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2002;19(3).
113. Ogutu BR, Nzila AM, Ochong E, Mithwani S, Wamola B, Olola CH, et al. The role of sequential administration of sulphadoxine/pyrimethamine following quinine in the treatment of severe *falciparum* malaria in children. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2005;10(5):484–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15860096>
114. Noranate N, Durand R, Tall A, Marrama L, Spiegel A, Sokhna C, et al. Rapid dissemination of *Plasmodium falciparum* drug resistance despite strictly controlled antimalarial use. *PLoS One* [Internet]. 2007;2(1):e139. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17206274>
115. Nacher M, Singhasivanon P, Gay F, Silachamroon U, Looareesuwan S. Case-control studies on host factors in severe malaria. *Trends Parasitol* [Internet]. 2001;17(6):253–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378013>
116. Quino H, Durand S, Maguiña C. Malaria *Plasmodium falciparum* en adultos hospitalizados de Iquitos: aspectos clínicos y epidemiológicos. *Acta Médica Peru*. 2001;18(2).
117. Roper MH, Torres RS, Goicochea CG, Andersen EM, Guarda JS, Calampa C, et al. The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2000;62(2):247–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10813480>
118. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med* [Internet]. 2001;344(4):257–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172152>
119. Safeukui-Noubissi I, Ranque S, Poudiougou B, Keita M, Traore A, Traore D, et al. Risk factors for severe malaria in Bamako, Mali: a matched case-control study. *Microbes Infect* [Internet]. 2004;6(6):572–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158191>
120. Sibley CH, Hunt SY. Drug resistance in parasites: can we stay ahead of the evolutionary curve? *Trends Parasitol* [Internet]. 2003;19(11):532–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580966>
121. Fleming AF. Maternal anaemia in northern Nigeria: causes and solutions. *World Health Forum*. 1987;8:5.
122. Purizaca M. La malaria en la gestacion. *Rev Peru Ginec Obs*. 2008;54:131–42.
123. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Akinboye DO, Yusuf BO, Ebong OO, et al. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria.

- Acta Trop [Internet]. 2005;95(3):183–93. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16023986>
124. Barnes KI, Lindegardh N, Ogundahunsi O, Olliaro P, Plowe C V, Randrianarivelojosia M, et al. World Antimalarial Resistance Network (WARN) IV: clinical pharmacology. *Malar J* [Internet]. 2007;6:122. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822537>
 125. Brabin BJ, WHO, Organization WH. The risks and severity of malaria in pregnant women. Department of Tropical Paediatrics and International Child Health, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; 1991.
 126. Ibrahim ML, Gay-Andrieu F, Adehossi E, Lacroix V, Randrianarivelojosia M, Duchemin JB. Field-based evidence for the linkage of pfcr1 and pfdhfr drug-resistant malaria genotypes and clinical profiles of severe malaria in Niger. *Microbes Infect* [Internet]. 2007;9(5):599–604. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409009>
 127. Bob NS, Diop BM, Renaud F, Marrama L, Durand P, Tall A, et al. Parasite polymorphism and severe malaria in Dakar (Senegal): a West African urban area. *PLoS One* [Internet]. 2010;5(3):e9817. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20352101>
 128. Wele M, Djimde AA, Guindo A, Beavogui AH, Traore IZ, Sadou A, et al. High frequency of PfCRT 76T in two Malian villages and its prevalence in severe relative to non-severe malaria. *Acta Trop* [Internet]. 2011;119(1):11–3. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300016>
 129. Nzila A. Antifolates: Pyrimethamine, Proguanil, Sulphadoxine and Dapsone. In: Staines HM, Krishna S, editors. *Treatment and Prevention of Malaria*. London; 2012. p. 326.
 130. Ruebush 2nd TK, Marquino W, Zegarra J, Neyra D, Villaroel R, Avila JC, et al. Practical aspects of in vivo antimalarial drug efficacy testing in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2003;68(4):391–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875285>

VII. TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables

Tabla 2. Información disponible del total de participantes del estudio, casos de malaria severa y complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=65)

Tabla 3. Características de la población de estudio, casos malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=65)

Tabla 4. Datos demográficos y de laboratorio de casos de malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, distribuidas por servicio de salud, 1998 (n=65)

Tabla 5. Frecuencia de mutaciones en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* en casos de malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Tabla 6. Frecuencia de genotipos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* en casos de malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Tabla 7. Frecuencia de las mutaciones y genotipos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* en casos de malaria severa y/o complicada por servicios de atención, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Tabla 8. Comparación de frecuencias de mutaciones y genotipos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* en casos de malaria severa y/o complicada con datos publicados por Salas y col en muestras de malaria no complicada, departamento de Loreto.

FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de trabajo del estudio de tesis

Figura 2. Histograma de parasitemia de los casos malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Figura 3. Resultados de PCR para la detección y diferenciación de *P. vivax* y *P. falciparum* en casos de malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Figura 4. Amplificación del gen *Pfdhfr* mediante PCR en muestras de casos con malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60). 1er PCR y PCR-anidado.

Figura 5. Amplificación del gen *Pfdhps* mediante PCR y RFLP para la identificación de las mutaciones S436A y A437G en muestras de pacientes con malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Figura 6. Determinación de las mutaciones K540E y A581G del gen *Pfdhps* mediante PCR alelo-específico en muestras de casos con malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Figura 7. Determinación de las mutaciones A613S y A613T del gen *Pfdhps* mediante PCR alelo-específico en muestras de casos con malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Tabla 1. Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Dimensión	Técnica o instrumento de medición
Género	Género del participante	Género en base a la información del sexo del participante registrado en la ficha clínica	Categórica dicotómica	Nominal	Femenino o masculino	Sujeto- Ficha clínica
Edad	Edad del participante	Edad en base a la información del participante registrado en la ficha clínica	Númerica, discreta	Razón	Años de edad	Sujeto- Ficha clínica
Servicio de atención	Servicios de atención hospitalaria	Servicio de atención del Hospital de Apoyo Iquitos donde fue enrolado	Categórica politómica	Nominal	Pediatría Obstetricia Medicina	Sujeto- Ficha clínica
Parasitemia	Numero de estadíos del parásito por volumen de sangre	Numero de estadíos asexuales de <i>P. vivax</i> por μL de sangre del participante en el día de enrolamiento (parásitos/ μL)	Númerica, continua	Razón	Parásitos/ μL	Sujeto- Ficha clínica
Mutación de <i>Pfdhfr</i>	Mutación puntual o cambio de un nucleótido de la secuencia nucleotídica del gen	Mutación que ocasiona un cambio de aminoácido (aa) en un codón determinado del gen. “aa123bb”	Categórica dicotómica	Nominal	Mutación o no mutación	PCR, secuenciamiento de ADN
Mutación de <i>Pfdhps</i>			Categórica dicotómica	Nominal		PCR-RFLP, PCR-alelo específico
Genotipo de <i>Pfdhfr</i>	Denotación de todas las mutaciones presentes en el gen	Denotación de todas las mutaciones presentes en el gen. “aa123bb/cc246dd”	Categórica dicotómica	Ordinales	Presencia o ausencia del genotipo	Base de datos del análisis molecular
Genotipo de <i>Pfdhps</i>			Categórica politómica	Ordinales		Base de datos del análisis molecular

Tabla 2. Información disponible del total de participantes del estudio, casos de malaria severa y complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=65)

Información del sujeto	Medicina (n=43)	Obstetricia (n=7)	Pediatría (n=15)	Total (n=65)
Disponibilidad de información demográfica-laboratorio				
Género	43	7	15	65
Edad	42	6	14	62
Parasitemia	41	6	14	61
Disponibilidad de muestras biológicas	43	7	15	65

Tabla 3. Características de la población de estudio, casos malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=65)

Características	Muestra total n (%)	Análisis molecular n (%)
	n=65	n=60
Género		
Femenino	34 (52%)	31 (52%)
Masculino	31 (48%)	29 (48%)
Servicio de atención		
Adultos	43 (66%)	39 (65%)
Niños	15 (23%)	15 (25%)
Gestantes	7 (11%)	6 (10%)
PCR malaria		
<i>P. falciparum</i>	60 (92%)	60 (100%)
Mixto <i>P. falciparum</i> / <i>P. vivax</i>	5 (8%)	0
	n=62	n=58
Mediana de edad (años)*	24 (3-84)	24 (3-78)
	n=61	n=56
Media geométrica de parasitemia (parásitos/ μ L)*	21,546 (80-1'500,000)	23,783 (80-1'500,000)

* rango (mínimo-máximo)

Tabla 4. Datos demográficos y de laboratorio de casos de malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, distribuidas por servicio de salud, 1998 (n=65)

Características	Total n(%)	Servicios de atención			valor p
		Medicina n (%)	Pediatría n (%)	Obstetricia n (%)	
	n=65	n=43	n=15	n=7	
Género					
Femenino	34 (52%)	20 (46%)	7 (47%)	7 (100%)	1.000
Masculino	31 (48%)	23 (53%)	8 (53%)	NA	
PCR malaria					
Monoinfección <i>P. falciparum</i>	60 (92%)	39 (91%)	15 (100%)	6 (86%)	0.346
Infección mixta <i>P.f/P.vivax</i>	5 (8%)	4 (9%)	0	1 (14%)	
	n=62	n=42	n=14	n=6	n=62
Edad (años)*	24 (3-84)	38 (15-84)	6 (3-13)	20 (16-27)	NA
	n=61	n=41	n=14	n=6	n=61
Parasitemia (parásitos/μL)					
Media geométrica	21,546	36,927	6,962	7,573	0.032
Rango	80-1´500,000	400 - 1´500,000	240 - 640,000	80 - 139,600	

Valor p calculados para la comparación entre los tres servicios de atención.

NA, no aplica

Tabla 5. Frecuencia de mutaciones en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* en casos de malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Genes	Frecuencia	
	n	%
<i>Pfdhfr</i>		
A16V	0	0
Inserción RB	50	83%
C50R	0	0
N51I	50	83%
C59R	0	0
S108N	60	100%
I164L	50	83%
<i>Pfdhps</i>		
S436A	1	2%
A437G	50	83%
K540E	48	80%
A581G	50	83%
A613S/T	0	0

RB: Inserción Repetición Bolivia

Tabla 6. Frecuencia de genotipos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* en casos de malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Genotipo	Número de codón						Frecuencia							
							n	%						
Genotipo de <i>Pfdhfr</i>														
	RB	...	51	...	108	...	164							
Simple	-		N		N		I	10 17%						
Cuádruple	BR		I		N		L	50 83%						
Genotipo de <i>Pfdhps</i>														
	436	437	...	540	...	581								
Silvestre	S	A		K		A		10 17%						
Cuádruple	A	G		E		G		1 2%						
Doble	S	G		K		G		2 3%						
Triple	S	G		E		G		47 78%						
Genotipo combinado														
	<i>Pfdhfr</i>						<i>Pfdhps</i>							
	RB	...	51	...	108	...	164	436	437	...	540	...	581	
Ocho	RB		I		N		L	A	G		E		G	1 2%
Cuádruple	RB		I		N		L	S	A		K		A	1 2%
	-		N		N		I	S	G		E		G	1 2%
Siete	RB		I		N		L	S	G		E		G	46 77%
Seis	RB		I		N		L	S	G		K		G	2 3%
Simple	-		N		N		I	S	A		K		A	9 14%

RB: inserción repetición Bolivia. Las celdas de color anaranjado muestra la presencia del aminoácido mutado en ese codón

Tabla 7. Frecuencia de las mutaciones y genotipos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* en casos de malaria severa y/o complicada por servicios de atención, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Genotipo		Medicina n (%)	Pediatría n (%)	Obstetricia n (%)	Valor <i>p</i> *
<i>Genotipo de Pfdhfr</i>					0.126
1M	S108N	4 (10%)	5 (33%)	1 (17%)	
4M	A16/RB/C50/N51I/S108N/I164L	35 (90%)	10 (67%)	5 (83%)	
<i>Genotipo de Pfdhps</i>					0.051
NM	S436/A437/K540/A581	4 (10%)	5 (33%)	1 (17%)	
2M	A437G/A581G	1 (2%)	0	1 (17%)	
3M	A437G/K540E/A581G	34 (87%)	9 (60%)	4 (67%)	
4M	S436A/A437G/K540E/A581G	0	1 (7%)	0	
Genotipo combinado					0.035
1M	<i>Pfdhfr</i> 1M + <i>Pfdhps</i> NM	4 (10%)	4 (27%)	1 (17%)	
4M	<i>Pfdhfr</i> 4M + <i>Pfdhps</i> NM	0	1 (7%)	0	
4M	<i>Pfdhfr</i> 1M + <i>Pfdhps</i> 3M	0	1 (7%)	0	
6M	<i>Pfdhfr</i> 4M + <i>Pfdhps</i> 2M	1 (2%)	0	1 (17%)	
7M	<i>Pfdhfr</i> 4M + <i>Pfdhps</i> 3M	34 (87%)	8 (53%)	4 (67%)	†0.02
8M	<i>Pfdhfr</i> 4M + <i>Pfdhps</i> 4M	0	1 (7%)	0	

NM: no-mutante, RB inserción Repetición Bolivia. †Análisis *post hoc* del genotipo combinado 7M calculó un valor *p* de 0.02. Los valores *p* en negrita son estadísticamente significativos $p < 0.05$

Tabla 8. Comparación de frecuencias de mutaciones y genotipos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* en casos de malaria severa y/o complicada con datos publicados por Salas y col en muestras de malaria no complicada, departamento de Loreto.

Genes	Casos MSC	Casos MNC	Valor p
	Datos propios	Salas y col*	
	n (%)	n=86	
Mutación en el gen <i>Pfdhfr</i>			
BR	50 (83%)	56%	0.001
N51I	50 (83%)	56%	0.001
S108N	60 (100%)	100	1.000
I164L	50 (83%)	56%	0.001
Mutación en el gen <i>Pfdhps</i>			
S436A	1 (2%)	0%	0.411
A437G	50 (83%)	56%	0.001
K540E	48 (80%)	35%	<0.001
A581G	50 (83%)	56%	0.001
Genotipos de <i>Pfdhfr</i>			
1M:S108N	10 (17%)	44%	0.001
4M:BR/N51I/S108N/I164L	50 (83%)	56%	0.001
Genotipos de <i>Pfdhps</i>			
No-mutante	10 (17%)	44%	0.001
2M: A437G/A581G	2 (3%)	21%	0.003
3M: A437G/K540E/A581G	47 (78%)	35%	<0.001
4M: S436A/A437G/K540E/A581G	1 (2%)	0%	0.411
Genotipos combinados de <i>Pfdhfr/Pfdhps</i>			
1M: <i>Pfdhfr</i> 1M + <i>Pfdhps</i> NM	9 (14%)	44%	<0.001
4M: <i>Pfdhfr</i> 4M + <i>Pfdhps</i> NM	1 (2%)	0%	0.411
4M: <i>Pfdhfr</i> 1M + <i>Pfdhps</i> 3M	1 (2%)	0%	0.411
6M: <i>Pfdhfr</i> 4M + <i>Pfdhps</i> 2M	2 (3%)	21%	0.003
7M: <i>Pfdhfr</i> 4M + <i>Pfdhps</i> 3M	46 (77%)	35%	<0.001
8M: <i>Pfdhfr</i> 4M + <i>Pfdhps</i> 4M	1 (2%)	0%	0.411

NM: no-mutante, RB: inserción Repetición Bolivia. Los valores p en negrita son estadísticamente significativos, $p < 0.025$, que es menor que el valor de corte 0.025 para el análisis estadístico de 1 cola. *Datos publicados por Salas en su tesis de maestría (73).

Figura 1. Fluxograma de trabajo del estudio te tesis

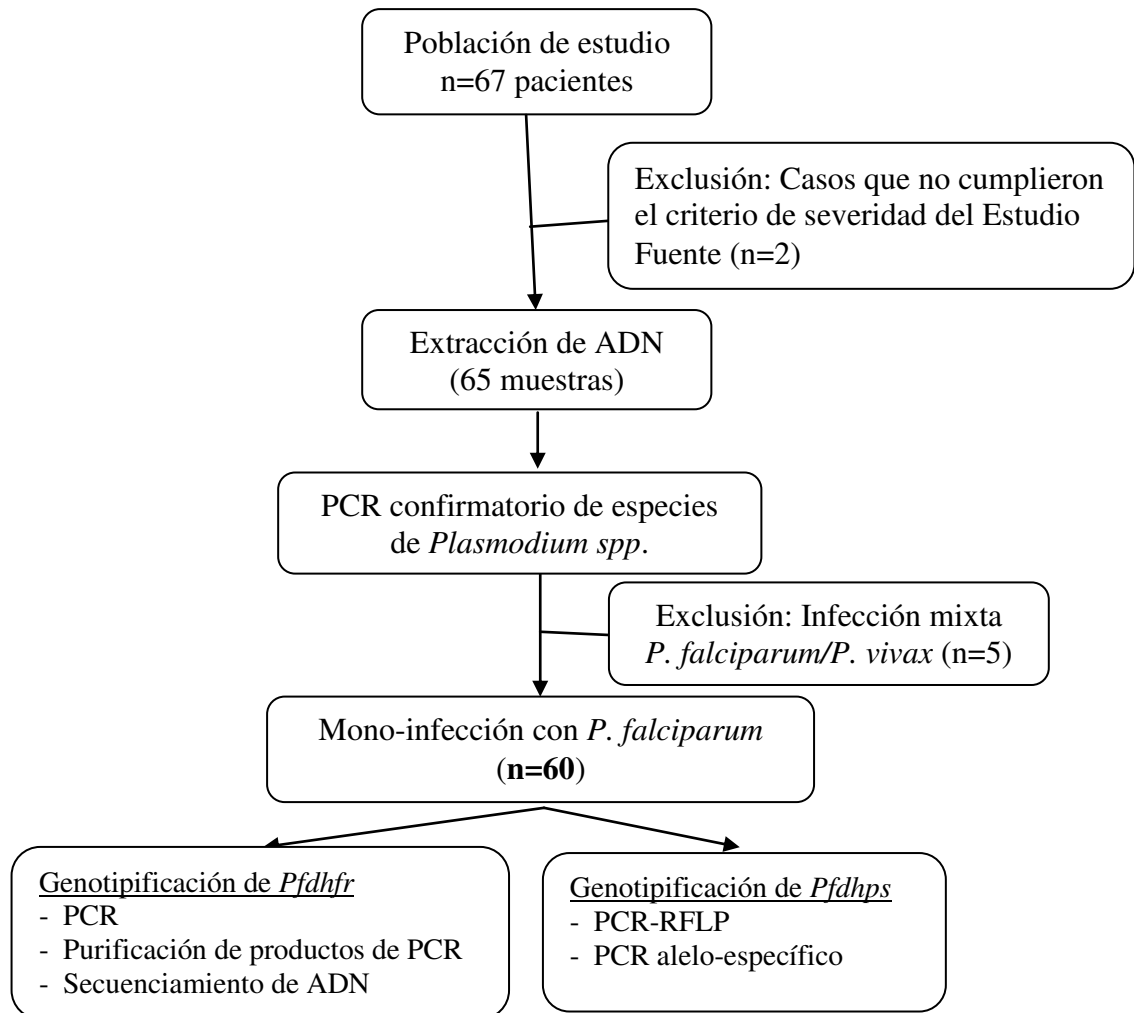
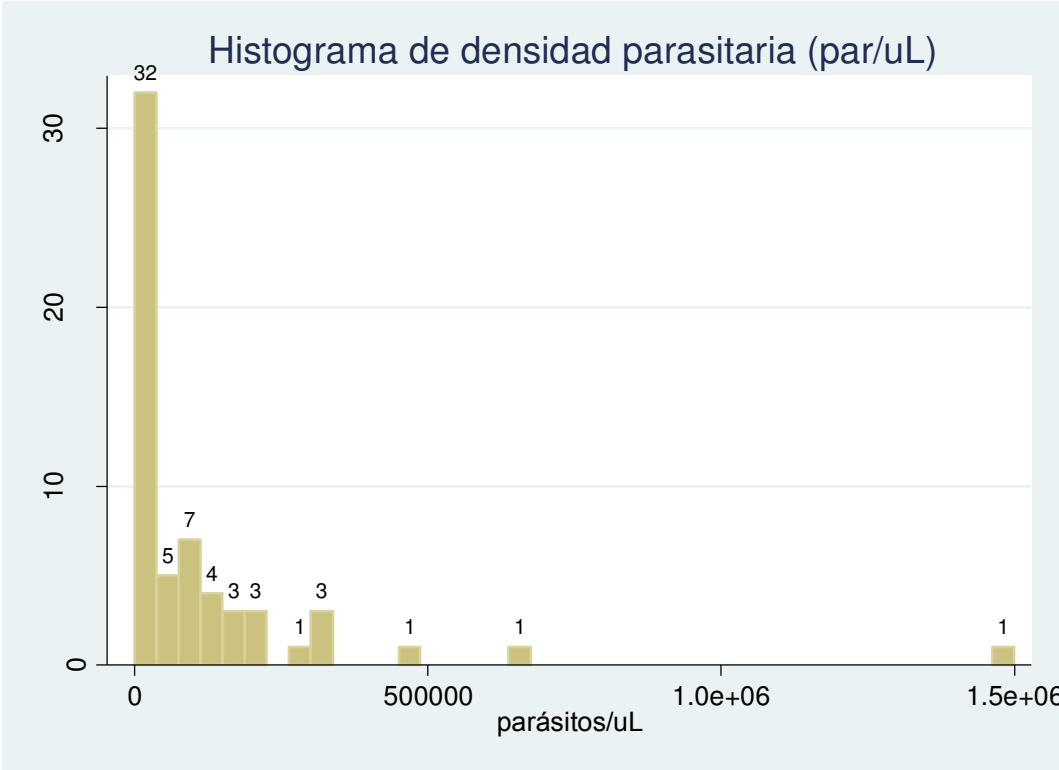


Figura 2. Histograma de parasitemia de los casos malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

1A. Histograma de densidad parasitaria



1B. Distribución de percentiles de la densidad parasitaria.

	Percentiles	Smallest
1%	80	80
5%	400	240
10%	560	400
25%	6820	440
50%	36040	
		Largest
75%	143900	331000
90%	281600	333300
95%	333300	640000
99%	1500000	1500000

Valores de la densidad parasitaria, par/ μ L

Figura 3. Resultados de PCR para la detección y diferenciación de *P. vivax* y *P. falciparum* en casos de malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

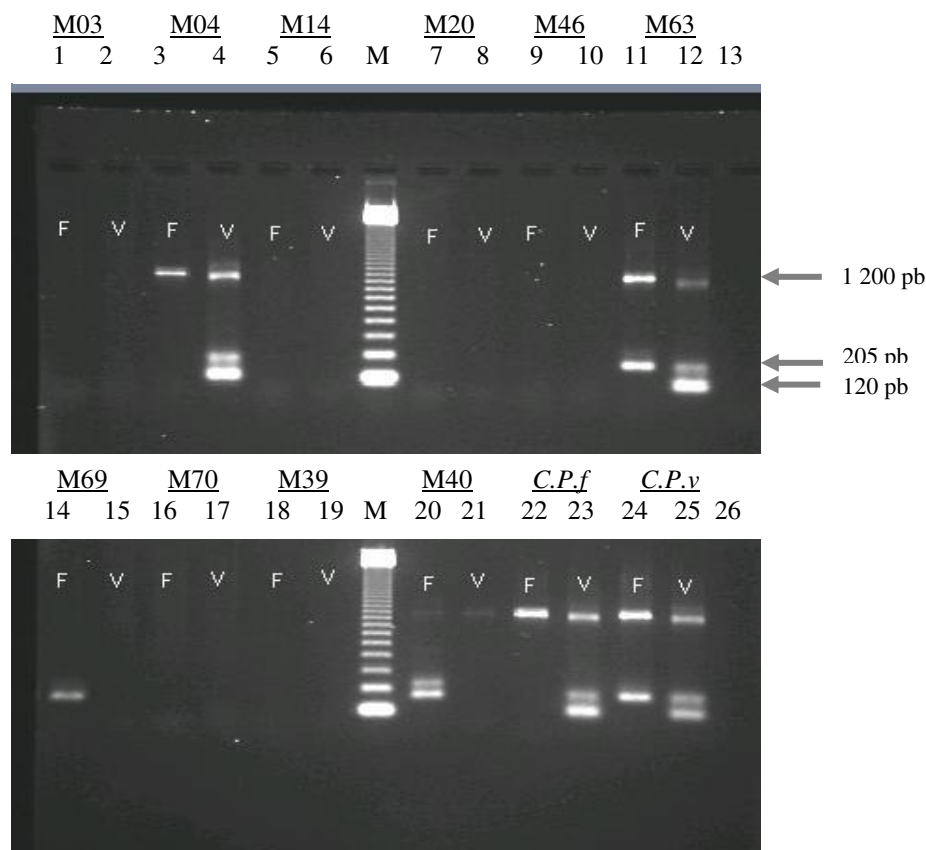
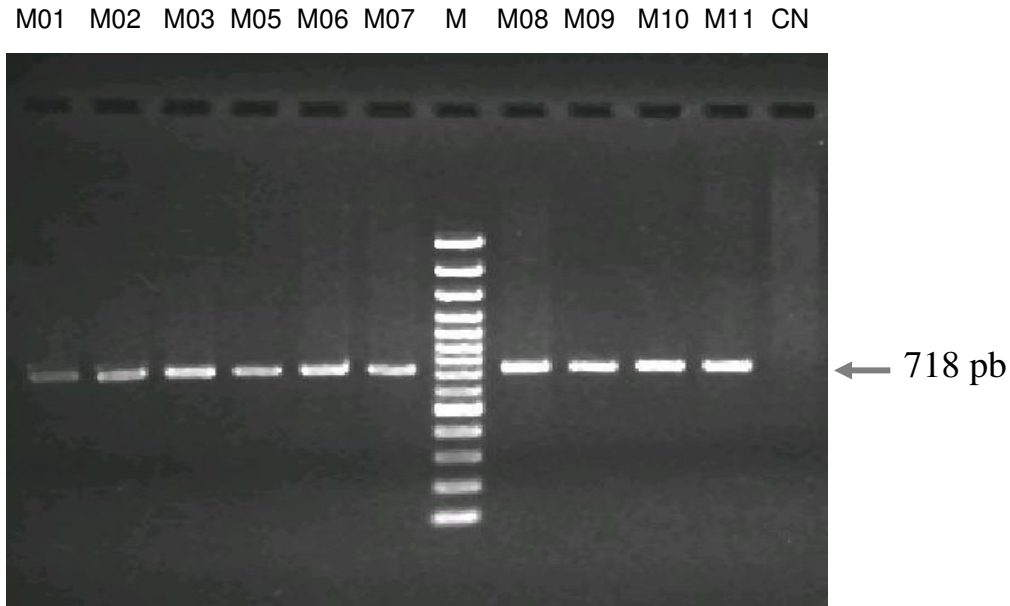


Figura. Productos amplificados analizados por electroforesis en gel de agarosa. F=PCR específico para *P. falciparum*; V= PCR específico para *P. vivax*. Carriles 1- 2, 3- 4, 5- 6, 7- 8, 9- 10, 11- 12, 14- 15, 16- 17, 18- 19, 20- 21, producto de PCR de las muestras de pacientes M03, M04, M14, M20, M46, M63, M60, M70, M39, M40 respectivamente; carril M, marcador molecular de ADN de 123 pb; ; carriles 22- 23, 24- 25, 13 y 26 producto de PCR de control positivo para *P. falciparum* (C.P.f), control positivo para *P. vivax* (C.P.v) y control negativo (C.N.). Los tamaños de los productos de amplificación son indicados con una flecha. La muestra M04 fue considerada como infección por *P. vivax*, la muestra M63 como infección mixta, las muestras M69 y M40 como *P. falciparum* y las demás como negativas o parasitemia menor del nivel de detección que es de 1 par/ μ L según comunicación personal con Carmen Lucas (Jefe de laboratorio de NAMRU-6, Departamento de Parasitología).

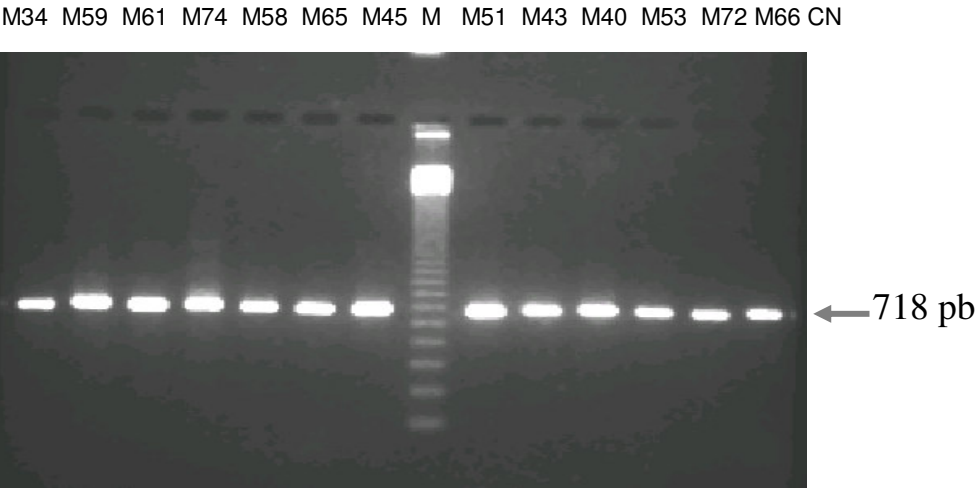
Figura 4. Amplificación del gen *Pfdhfr* mediante PCR en muestras de casos con malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60). 1er PCR y PCR-anidado.

4A. Gel del 1er PCR del gen *Pfdhfr*



Producto de amplificación de 718 pb; carril M, marcador de ADN de 100 pb; carril CN, control negativo.

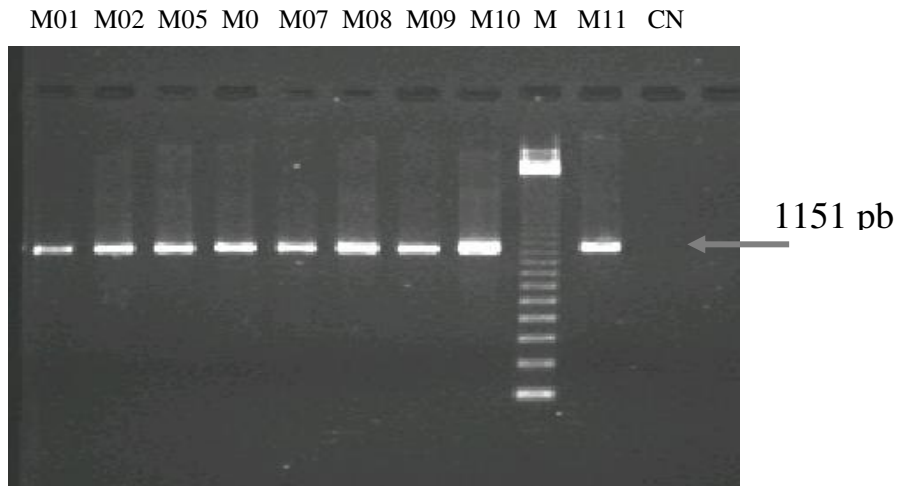
4B Gel del PCR anidado del gen *Pfdhfr*.



Producto de amplificación de 700 pb; carril M, marcador de ADN de 123 pb; carril CN, control negativo.

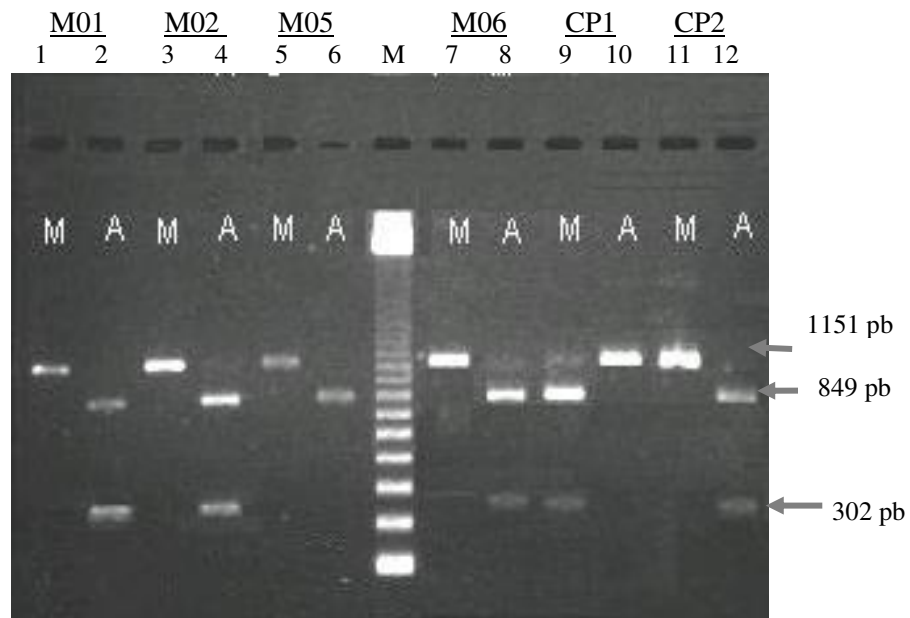
Figura 5. Amplificación del gen *Pfdhps* mediante PCR y RFLP para la identificación de las mutaciones S436A y A437G en muestras de pacientes con malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

5A. PCR anidado del gen *Pfdhps*



Producto de amplificación de 1151 pb; Carril M, marcador de ADN de 123 pb; carril CN, control negativo

5B. RFLP del gen *Pfdhps* para identificación de los alelos en el codón 436 y 437



El producto de PCR es digerido con las enzimas de restricción MspAII (M) y AvaII (A); CP1, cepa de referencia D6; CP2, cepa de referencia 3D7; carril M, marcador de ADN de 123 pb.

Figura 6. Determinación de las mutaciones K540E y A581G del gen *Pfdhps* mediante PCR alelo-específico en muestras de casos con malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

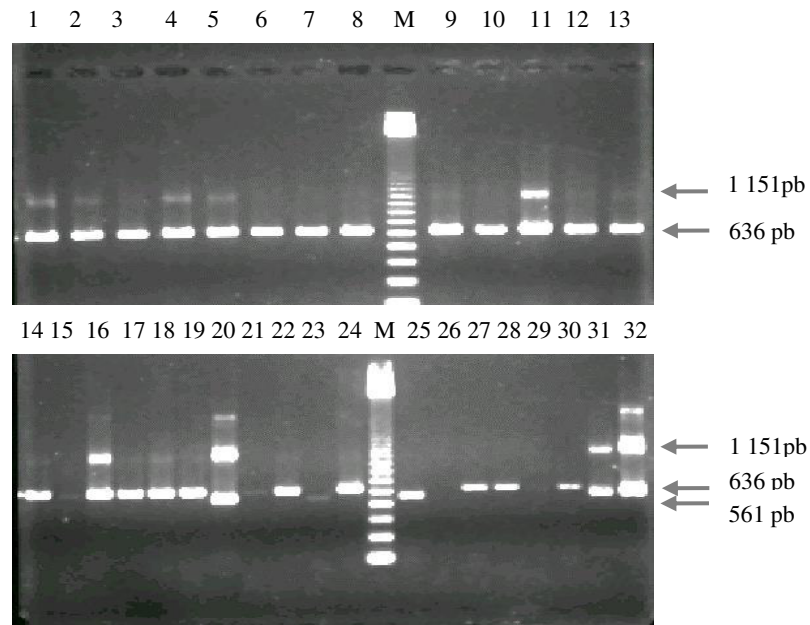


Figura 6A. PCR anidado alelo-específico de los alelos del codón 540 del gen *Pfdhps*. El producto de amplificación de 561 pb corresponde al alelo silvestre y el de 636 pb al alelo mutante, la banda de amplificación de 1151 pb corresponde al PCR anidado del *Pfdhps*; carril 32, cepa de referencia D6 no mutante. Carriles 20, 23, 25 y 31 son corresponden a las muestras silvestres M28, M31, M33 y M47

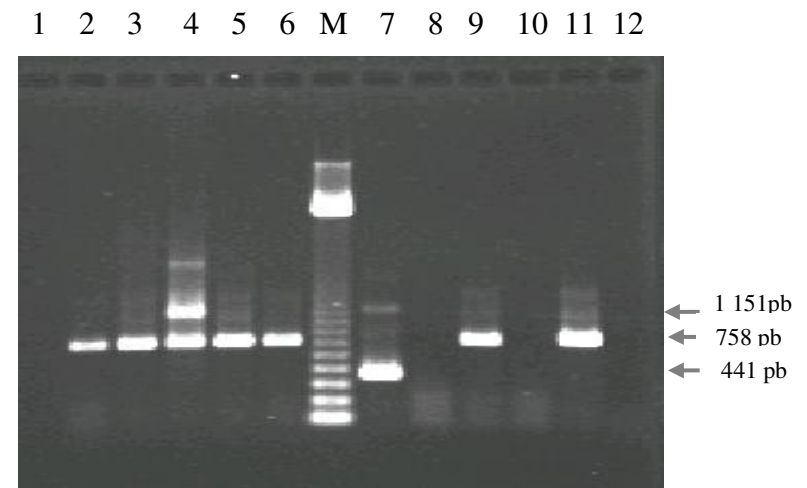


Figura 6B. PCR anidado alelo-específico de los alelos del codón **581** del gen *Pfdhps*. El producto de amplificación de 441 pb corresponde al alelo silvestre y el de 758 pb al alelo mutante la banda de amplificación de 1151 pb corresponde al PCR anidado del *Pfdhps*; carril 6, cepa de referencia D6 no mutante (C.S.); carril 7, C.N., control negativo; Carril M, marcador de ADN de 123 pb. Carril 7 corresponde a la muestra silvestre M47.

Figura 7. Determinación de las mutaciones A613S y A613T del gen *Pfdhps* mediante PCR alelo-específico en muestras de casos con malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

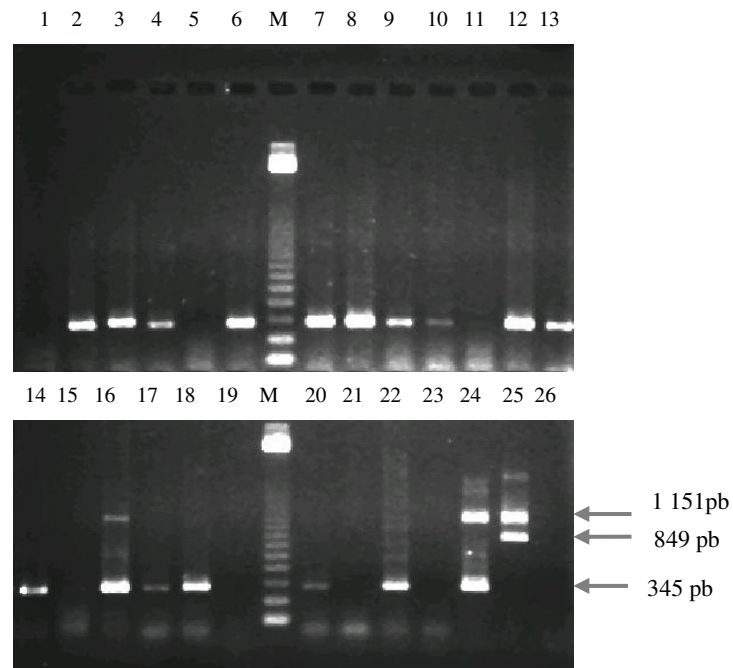


Figura 7A. PCR anidado alelo-específico de los alelos del codón 613 (alanina a serina) del gen *Pfdhps*. Los productos de amplificación de 345 pb y de 849 pb, corresponden al alelo silvestre y mutante a serina, respectivamente. Carril 5 (C.M.), cepa de referencia mutante W2; carril 6 (C.N.), control negativo; carril M, marcador de ADN de 123 pb. Todas las muestras tuvieron el alelo silvestre en este codón.

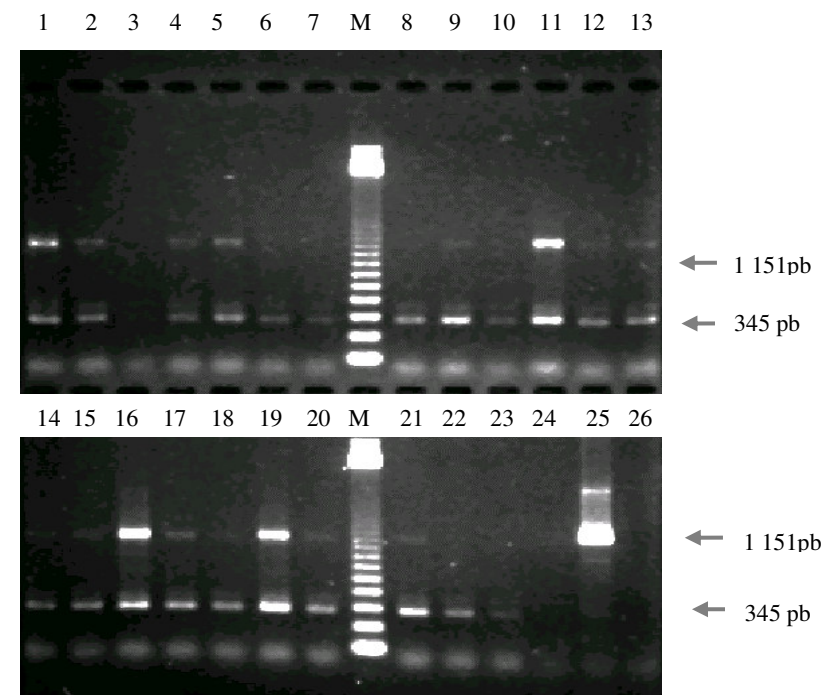
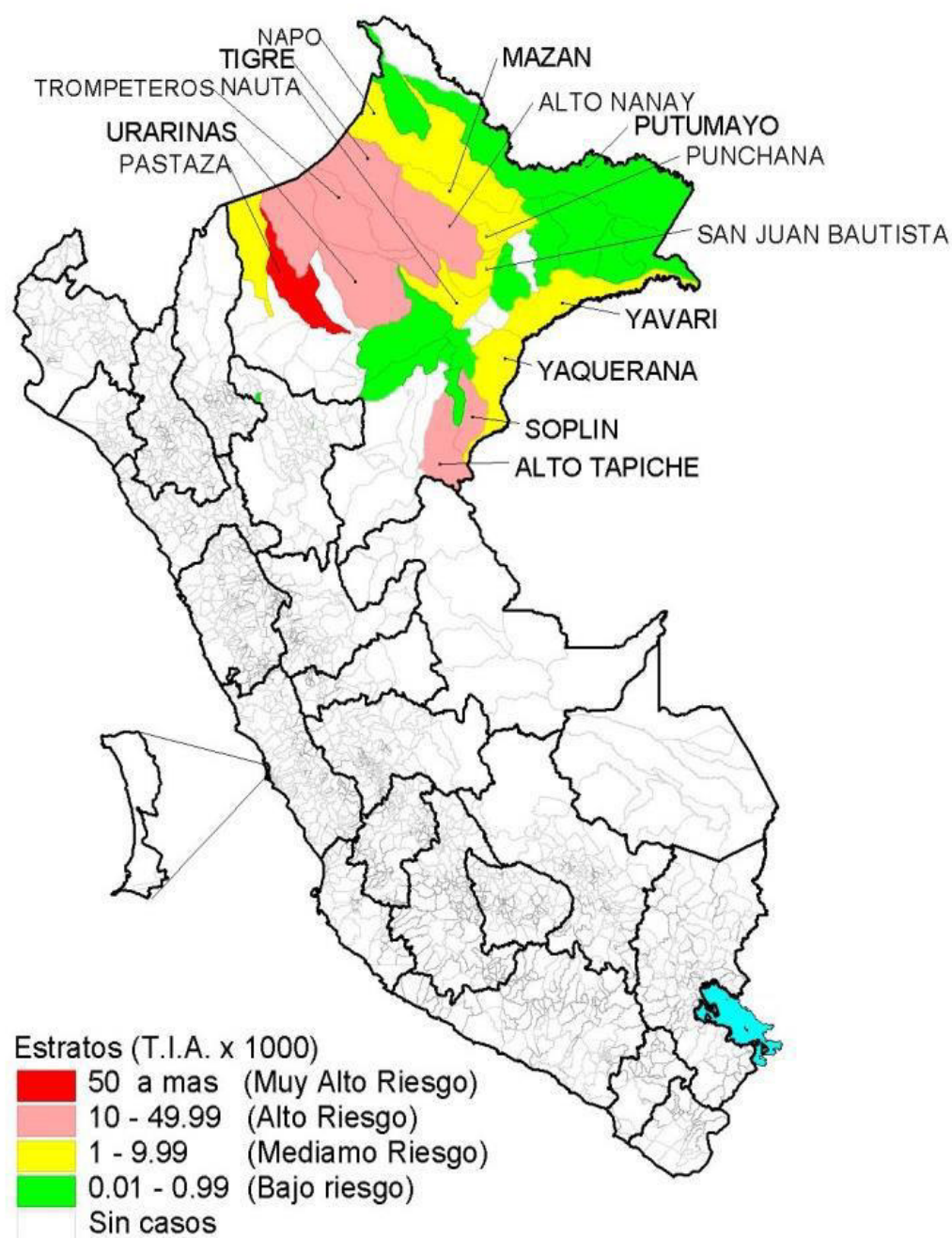


Figura 7B. PCR anidado alelo-específico de los alelos del codón 613 (alanina a treonina) del gen *Pfdhps*. El producto de amplificación de 345pb corresponde al alelo silvestre. Carril 6 (C.S.), cepa de referencia W2 (no mutante a treonina); carril 6 (C.N.), control negativo; carril M, marcador de ADN de 123 pb. Todas las muestras tuvieron el alelo silvestre en este codón.

VIII. ANEXOS

- Anexo 1. Mapa del Perú, área con casos de malaria por *P. falciparum*, año 2014.
- Anexo 2. Vía de síntesis *de novo*, de salvataje para terahidrofolato en *P. falciparum*.
- Anexo 3. Evolución del tratamiento de malaria por *P. falciparum* en nuestro país.
- Anexo 4. Criterios de inclusión y exclusión del estudio fuente. (Traducción no oficial)
- Anexo 5. Procedimiento estándar utilizado para la extracción de ADN.
- Anexo 6. Cebadores usados para la determinación de especie de Plasmodium.
- Anexo 7. Cebadores usados para la amplificación y estudio de los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps*
- Anexo 8. Procedimiento estándar utilizado para la amplificación del gen *Pfdhfr* y secuenciamiento de ADN
- Anexo 9. Procedimiento estándar utilizado para la purificación de productos de PCR y de productos de secuenciamiento
- Anexo 10. Procedimiento estándar utilizado para la amplificación del gen *Pfdhps* y PCR-RFLP para la identificación de las mutaciones S436A y A437G
- Anexo 11. Procedimiento estándar utilizado para la amplificación de los alelos silvestre y mutante de los codones 540, 581 y 613 del gen *Pfdhps* por PCR anidado alelo-específico
- Anexo 12. Evolución de las mutaciones en *Pfdhfr* según Plowe, 2001.
- Anexo 13. Lista de genotipos de las muestras del estudio de tesis, casos con malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Anexo 1. Mapa del Perú, área con casos de malaria por *P. falciparum*, año 2014



Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica DGE-MINSA. Sala Situacional, Año 2014 (11). Mapa de Riesgo de malaria por *P. falciparum* por distritos

Anexo 2. Vía metabólica de los folatos en *P. falciparum*.

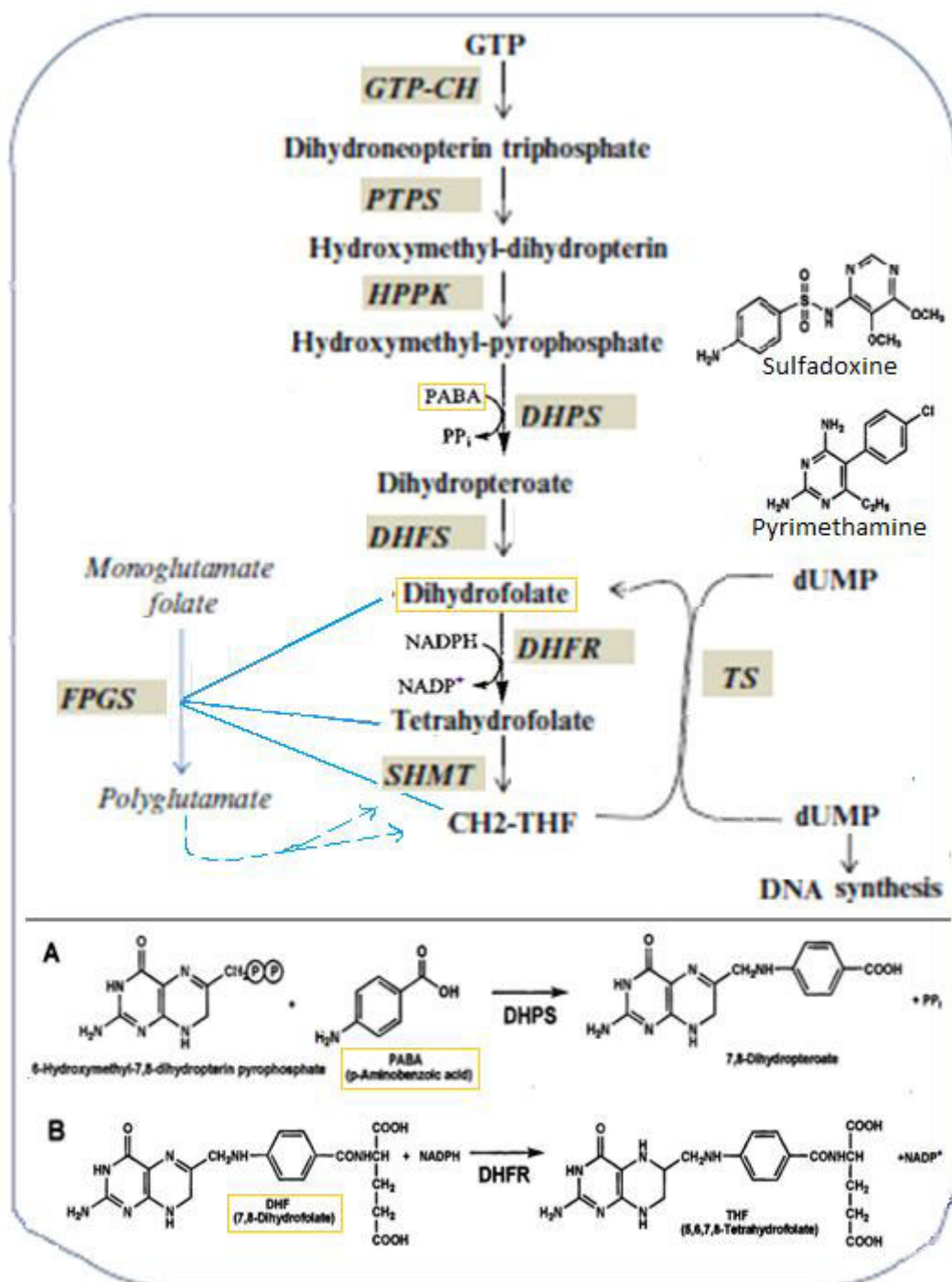


Figura. El sitio de acción de las drogas antimaláricas se muestra para la sulfadoxina (DHPS) y para pirimetamina (DHFR). Fuente: Libro Stains - Treatment and prevention of malaria 2012 (pag115) y Rosenthal – Antimalarial Chemotherapy – 2001 (pag187de (72) y pag115 de (129)).

Anexo 3. Evolución del tratamiento de malaria por *P. falciparum* en nuestro país

Cuadro clínico	Área geográfica	1958-1994 Monoterapia		1994-2000 Terapia múltiple	2001-2015 Terapia combinada	2015-presente* Terapia combinada
		1958-80's	90's			
Malaria no complicada	Costa Norte		CQ	1L: SP + PQ 2L: MQ+AS 3L: Quin+ TCQ/Clin	1L: SP + AS 2L: MQ + AS 3L: Quin + Clin + PQ	1L: MQ + AS + PQ(1er día) 2L: Quin + Clin + PQ(3er día)
	Macro región Amazónica	CQ+PQ (distribución no oficial)		1L: SP + PQ 2L: MQ + AS 3L: Quin + Clin	1L: MQ + AS 2L: Quin + Clin + PQ	
Malaria severa y/o complicada	Todo el Perú		Quin	Quin + Clin	1L: Derivados de artemisina (vía endovenosa) 2L: Quin + Clin	1L: Derivados de artemisina + Clin (vía endovenosa) 2L: Quin + Clin

CQ: cloroquina, PQ: primaquina, Quin: quinina, TCQ: tetraciclina, Clin: clindamicina, SP: sulfadoxina/ pirimetamina, AS: artesunato, MQ: mefloquina
 Información tomada de la RD N°02-96, N°094-2001, RM N°076-2007 y *RM N°116-2015 (7,29,130)

Anexo4. Criterios de inclusión y exclusión del estudio fuente. (Traducción no oficial)

Criterios de inclusión:

Todos los pacientes que ingresaron a los servicios de Medicina, Pediatría, o Obstetricia con un diagnóstico de malaria severa y/o complicada fueron elegibles para entrar al estudio.

La malaria severa y complicada es definida como:

Gota gruesa positiva por las formas asexuales de *P. falciparum* y:

1. Malaria cerebral:
 - Coma (sin respuesta localizada al dolor), persistente por > 6 horas si el paciente tuvo experiencia o una convulsión generalizada.
 - Exclusión de otras causas de encefalopatía (ej. encefalitis viral/bacteriana/fúngica).
2. Anemia normocítica severa: Definida como (en Loreto):
 - Hemoglobina ≤ 6.0 mg/dl
 - Hematocrito $< 20\%$
 - Pérdida documentada de volumen de RBC $> 30\%$ debido a hemólisis (o secuestro).
3. Falla renal: Definida como:
 - Nitrógeno uréico sanguíneo (BUN) > 40 mg/dl sin evidencia de deshidratación severa
 - Creatinina > 3 mg/dl
 - Oliguria
4. Edema pulmonar
5. Hipoglicemia (especialmente en pacientes tratados con quinina y mujeres embarazadas), < 50 mg/dl.
6. Colapso circulatorio, shock.
7. Sangrado espontáneo
8. Convulsiones generalizadas repetitivas (> 2).
9. Acidemia/acidosis.
10. Hemoglobinuria malarial.
11. Hiperparasitemia $> 200,000$ parásitos/ μ L or $> 5\%$ of RBCs.
12. Ictericia
13. Pacientes con infección concurrente (neumonía o malaria aguda) y malaria severa por *P. falciparum* fueron incluidos en el estudio, pero fueron analizados separadamente debido a la intrínseca tasa alta de mortalidad.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes o apoderados que no quisieron firmar el consentimiento informado.
2. Pacientes sin malaria severa y/o complicada por *P. falciparum*.

Anexo 5. Procedimiento estándar utilizado para la extracción de ADN.

Se siguió las instrucciones del fabricante, las que se encuentran en el protocolo QIAGEN®, descritas a continuación.

Instrucciones previas:

- Colocar las muestras a temperatura ambiente.
- Calentar el baño maría o bloque caliente a 56°C para usar en el paso 4.
- Colocar el agua destilada a temperatura ambiente para la elución en el paso 10.
- Todas las centrifugaciones se realizarán a temperatura ambiente.
- Microtubos de 1.5mL autoclavados o libres de ADNasa y ARNasa.
- Usar tips con filtro

1. Colocar 20 µL de **proteasa QIAGEN** (o proteinasa K) en el fondo de un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Añadir 200 µL de muestra de sangre total al tubo de microcentrífuga del paso 1. Mezclar en un vortex.
3. Añadir 200 µL de **Buffer AL QIAGEN** y luego mezclar en un vortex por 15 segundos.
4. Incubar el tubo del paso 3 a 56 °C por 10 minutos.
5. Centrifugar ligeramente el tubo de microcentrífuga para remover gotas de evaporación de la tapa.
6. Añadir 200 µL de etanol (96- 100%) a la muestra, mezclar en un vortex por 15 segundos. Centrifugar ligeramente para remover las gotas de la tapa.
7. Cuidadosamente transferir con una micropipeta de 1mL la mezcla del paso 6 a una columna **QIAamp Spin column** (con su tubo colector de 2 mL) y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Transferir la columna a otro tubo colector (provisto), y descartar el tubo que contenía el filtrado.
8. Cuidadosamente abrir la tapa de la columna **QIAamp Spin column** y añadir 500 µL de **Buffer AW1 QIAGEN** sin tocar el borde de la columna. Cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Transferir la columna a otro tubo colector (provisto), y descartar el tubo que contenía el filtrado.
9. Cuidadosamente abrir la tapa de la columna **QIAamp Spin column** y añadir 500 µL de **Buffer AW2 QIAGEN** sin tocar el borde de la columna. Cerrar la tapa y centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos. En caso de que se observe alguna traza de buffer AW2 transferir la columna a otro tubo colector limpio (tubo de microcentrífuga de 1.5ml) y centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto.
10. Trasladar la columna **QIAamp Spin column** a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y descartar el tubo de colección usado. Cuidadosamente abrir la tapa de la columna y añadir 75 µL de buffer EB. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, y luego centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.

Fuente: QIAampR ADN Mini and Blood Mini Handbook QIAGEN (pag. 26-28)
<http://www.qiagen.com/resou rces/download.aspx?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=EN&ver=1>

Anexo 6. Cebadores usados para la determinación de especie de *Plasmodium*.

PCR	Cebador	Secuencia (5'→3') ¹	S/A ²	Tamaño (pb)	Posición ³	Tm °C ⁴
Género <i>Plasmodium</i>	rPLU6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	S	23	606- 628* 605- 627**	49.3
	rPLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	A	21	1716- 1736* 1642- 1666**	48.6
Especie <i>P. falciparum</i>	rFAL1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	S	30	664-693*	58.0
	rFAL2	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	A	30	840- 869*	62.2
Especie <i>P. vivax</i>	rVIV1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	S	30	666-695**	57.6
	rVIV2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	A	30	757-786**	64.8

1 Secuencia de cebadores tomado de Snounou y col 1993 (77).

2 S: sentido, A: antisentido, indica la dirección del primer en la secuencia de ADN.

3 *Posición de los cebadores con respecto a las secuencias reportadas por *McCutchan,T.F., y col. en 1988 con código de acceso del Genbank M19173. ** Qari,S.H. y col en 1994 con código de acceso del Genbank U03079.

4 Tm: Temperatura de hibridación óptima teórica del oligonucleótido en una solución de 50mM de NaCl

Anexo 7. Cebadores usados para la amplificación y estudio de los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps*.

PCRs	Cebador1	Secuencia (5'→3') ²	S/A ³	Tamaño (pb)	Posición ⁴	Tm°C ⁵
<i>Pfdhfr</i>						
1 ^{er} PCR	AMP1	TTTATATTTTCTCCTTTT	S	20	21- 1	46
	AMP2	CATTTTATTATTCGTTTCT	A	20	680- 699	48
PCR-anidado	SP1	ATGATGGAACAAGTCTGCGAC	S	21	1-21	51.5
	SP2	ACATTTTATTATTCGTTTTC	A	20	681- 700	48
Secuenciamiento	AMP2	CATTTTATTATTCGTTTCT	A	20	680- 699	48
	SP3	TTTAATTTCCCAAGTAAAC	A	20	451- 470	50
<i>Pfdhps</i>						
1 ^{er} PCR	#M3717	CCATTCCTCATGTGTATACAACAC	S	24	57- 34	50.5
	#186	GTTTAATCACATGTTTGCACCTTC	A	24	2572- 2595	50.4
PCR-anidado	#185	TGATACCCGAATATAAGCATAATG	S	24	1- 24	50.3
	#218	ATAATAGCTGTAGGAAGCAATTG	A	23	2455-2477	47.6
Mutación en el codón 540	CD70	GGAAATCCACATACAATGGAA <u>A</u>	S	22	591- 612	50.8
	CD71	gTAGATTATCATAATTTGTTAGT <u>A</u>	A	25	612- 636	39.7
Mutación en el codón 581	#261	CTATTTGATATTGGATTAGGATT <u>T</u>	S	26	711- 736	49.5
	#201	AATAGATTGATCATGTTTCTT <u>C</u>	A	23	736- 758	46.6
Mutación en el codón 613	#233	GGATATTCAAGAAAAAGATTAT <u>A</u>	S	25	807- 831	45.7
	#251	TTTGATCATTTCATGCAATGG <u>C</u>	A	22	831- 852	54.6
	#226	GATCATTTCATGCAATGGG <u>A</u>	A	19	831- 849	54

1. Los cebadores AMP1, AMP2 fueron tomados de Plowe (53). Los cebadores SP1, SP2 Y SP3 fueron tomados de Gyang (81). Los cebadores usados para amplificar fragmentos del gen *Pdhps* fueron tomados de Wang (82), a excepción de CD70 y CD71 que son de Shaio (84). 2 El cambio de base en los cebadores para los PCRs-alelo específicos de la cepa silvestre (CD70, #201, #251, #226) y de la cepa mutante (CD71, #261, #233) está subrayado y de color rojo. Las bases en formato de letra minúscula indican el cambio de base en el cebador que no es complementario a la secuencia blanco. 3 S: sentido, A: antisentido. 4 Código de acceso del Genbank Z30654 para el gen *Pfdhfr* (Brooks 2004) y código de acceso del Genbank [XM_001351443](#) para el gen *Pfdhps* (Hall 2002). 5 Tm: Temperatura de hibridación óptima teórica del cebador en una solución de 50mM de NaCl.

Anexo 8. Procedimiento estándar utilizado para la amplificación del gen *Pfdhfr* y secuenciamiento de ADN

1^{er} PCR: con cebadores AMP1 y AMP2

A. PCR (50 µL reacción)

8.0 µL dNTPs (5 mM)
5.0 µL buffer de PCR 10X
1.5 µL MgCl₂ (50 mM)
1.0 µL Cebador AMP1 (50 µM)
1.0 µL Cebador AMP2 (50 µM)
0.3 µL *Taq*ADN Polimerasa (5U/ µL)
28.2 µL Agua destilada para PCR
(libre de ADNasa, RNasa)
Añadir 5µL de ADN extraído.

B. Condiciones de amplificación

Denaturación: 95 °C por 3 minutos (1 ciclo)
95 °C por 30 segundos
Hibridación: 45 °C por 45 segundos } 45 ciclos
72 °C por 45 segundos
Extensión: 72 °C por 5 minutos (1 ciclo)
Mantener a 4°C hasta su uso.

PCR anidado con los cebadores Sp1 y Sp2

A. PCR (50 µL reacción)

8.0 µL dNTPs (5 mM)
5.0 µL buffer de PCR 10X
3.0 µL MgCl₂ (50 mM)
1.0 µL Cebador SP1 (50 µM)
1.0 µL Cebador SP2 (50 µM)
0.12 µL *Taq*ADN Polimerasa (5U/ µL)
26.88 µL Agua destilada para PCR
(libre de ADNasa, ARNasa)
Añadir 5 µL del producto del 1^{er} PCR

B. Condiciones de amplificación

Denaturación: 94 °C por 4 minutos (1 ciclo)
94 °C por 50 segundos
Hibridación: 50 °C por 1 minuto } 45 ciclos
72 °C por 1 minuto
Extensión: 72 °C por 7 minutos (1 ciclo)
Mantener a 4°C hasta su uso.

Reacción de secuenciamiento con el kit BDT v3.1

A. PCR (20 µL reacción)

4 µL Mix BDT v3.1
4 µL Buffer de secuenciamiento 5X
0.5 µL Cebador (concentración inicial 20 µM)
7.5 µL Agua destilada para PCR
(libre de ADNasa y ARNasa)
4 µL* de producto de PCR
purificado de 1er PCR o PCR
anidado (20ng)

B. Condiciones de amplificación

Denaturación: 96 °C por 1 minuto (1 ciclo)
96 °C por 10 segundos
Hibridación: 50 °C por 5 segundos } 25 ciclos
60 °C por 4 minutos
Mantener a 4°C hasta su uso.
-La velocidad del termociclador es con “tipo 9600”.

Anexo 9. Procedimiento estándar utilizado para la purificación de productos de PCR y de productos de secuenciamiento

A. Purificación de productos de PCR, kit Qiaquick

Instrucciones previas: Añadir etanol 100 % al buffer **PE QIAGEN**, antes de usar (ver en la botella el volumen a añadir). Todas las centrifugaciones deberán realizarse a temperatura ambiente.

1. Colocar 5 volúmenes de **buffer PBI QIAGEN** a un volumen de producto de reacción de PCR y mezclar.
2. Para extraer el ADN, transferir la mezcla a una columna **QIAquick column** (en un tubo colector de 2 mL) sin tocar el borde, cerrar la tapa, y centrifugar a 13 000 rpm por 30 – 60 segundos. Transferir la columna a otro tubo colector (provisto), y descartar el tubo que contenía el filtrado.
3. Para lavar, añadir 750 µL de **Buffer PE QIAGEN** sin tocar el borde de la columna. Cerrar la tapa y centrifugar a 13 000 rpm por 30- 60 segundos. Eliminar el sobrenadante y colocar la columna en el mismo tubo colector (seco) y centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto.
4. Trasladar la columna **QIAquick column** a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y descartar el tubo de colección usado. Cuidadosamente abrir la tapa de la columna y añadir 30 µL de buffer EB. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto, y luego centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto.

Fuente: QIAquickr PCR Purification kit -QIAquickr Spin Handbook QIAGEN. Pag 19-20, <http://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=05356d52-ff29-4ac2-be49-48cba2381cfa&lang=EN&ver=1>

B. Purificación de productos de PCR de secuenciamiento, kit BigDye v3.1

Se usó el método de precipitación con Etanol/ Acetato de Sodio.

1. Añadir 60µL de la siguiente mezcla a los 20 µL de reacción de secuenciamiento
 - 3 µL of solución de buffer Acetato de sodio 3M
 - 62.5 µL Etanol 100% (-20°C)
 - 14.5 µL Agua destilada para PCR (libre de ADNasa y ARNasa)
2. Añadir 60 µL de la mezcla al tubo de reacción de secuenciamiento.
3. Mezclar e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar por 20 minutos a 14 000 rpm, eliminar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta.
5. Añadir 200 µL de Etanol al 70% (-20°C).
6. Centrifugar por 5 minutos a 14 000 rpm, eliminar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. 14 000 rpm, y secar por 2 minutos a 70°C.
7. Añadir 12 µ L de Hi-Di Formamida, mezclar bien y denaturar por 4 minutos a 94°C, inmediatamente después colocar los tubos en una bandeja con hielo, mantenerlo a 4 °C hasta su corrida en el secuenciador.

Fuente: BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit protocol (pag4-7), http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_081527.pdf

Anexo 10. Procedimiento estándar utilizado para la amplificación del gen *Pfdhps* y RFLP para la identificación de las mutaciones S436A y A437G

1^{er} PCR:

A. PCR (50 µL reacción)

4.0 µL dNTPs (5 mM)
5.0 µL buffer de PCR 10X
2.5 µL MgCl₂ (50 mM)
0.14 µL Cebador #186 (50 µM)
0.14 µL Cebador M3717 (50 µM)
0.12 µL *Taq*ADN Polimerasa (5U/ µL)
33.1 µL Agua destilada para PCR
(libre de ADNasa, ARNasa)
Añadir 5µL de ADN extraído.

B. Condiciones de amplificación

Denaturación: 95°C por 3 minutos (1 ciclo)
Hibridación: 50 °C por 20 segundos (1 ciclo)
Extensión: 70 °C por 3 minutos
90 °C por 20 segundos } 30 ciclos
50°C por 20 segundos }
70 °C por 10 minutos (1 ciclo)
Mantener a 4°C hasta su uso

PCR-RFLP:

PCR anidado (Necesario para el RFLP para identificación de los alelos en los codones 436 y 437.

A. PCR anidado (50 µL reacción)

4.0 µL dNTPs (5 mM)
5.0 µL buffer de PCR 10X
2.5 µL MgCl₂ (50 mM)
0.28 µL Cebador #185 (50 µM)
0.28 µL Cebador #218 (50 µM)
0.12 µL *Taq*ADN Polimerasa (5U/ µL)
32.82 µL Agua destilada para PCR
(libre de ADNasa,ARNasa)
Añadir 5µL del producto del 1^{er} PCR

B. Condiciones de amplificación

Denaturación: 95°C por 3 minutos (1 ciclo)
Hibridación: 50 °C por 30 segundos (1 ciclo)
Extensión: 70 °C por 3 minutos
90 °C por 30 segundos } 20 ciclos
50°C por 30 segundos }
70 °C por 10 minutos (1 ciclo)
Mantener a 4°C hasta su uso

Cortes con enzimas de restricción MspA1I y AvaII

A. RFLP para la Mutación S436A (20 µL reacción)

2.0 µL Buffer4 (10X)
0.2 µL BSA 100X
0.5 µL Mspa1I (10u/µl)
12.3 µL Agua destilada para PCR
(libre de ADNasa, ARNasa)
Añadir 5µL del producto del PCR

B. RFLP para Mutación A437G (20 µL reacción)

2.0 µL Buffer4 (10X)
0.5 µL Mspa1I (10u/µl)
12.5 µL Agua destilada para PCR
(libre de ADNasa, ARNasa)
Añadir 5µL del producto del PCR
anidado

Incubar a 37°C por 90 min e inmediatamente y colocarlo a 4°C.

Anexo 11. Procedimiento estándar utilizado para la amplificación de los alelos silvestre y mutante de los codones 540, 581 y 613 del gen *Pfdhps* por PCR anidado alelo-específico

PCR anidado alelo-específico para el codón 540

A. PCR (25 µL reacción)

2.5 µL dNTPs (5 mM)
 2.5 µL buffer de PCR 10X
 1.25 µL MgCl₂ (50 mM)
 0.05 µL Cebador #185 (50 µM)
 0.05 µL Cebador #218 (50 µM)
 0.12 µL Cebador #CO70 (50 µM)
 0.12 µL Cebador #CO71 (50 µM)
 0.06 µL *Taq*ADN Polimerasa (5U/ µL)
 13.35 µL Agua destilada para PCR
 (libre de ADNasa, ARNasa)
 Añadir 5µL de producto del 1^{er} PCR

B. Condiciones de amplificación

Denaturación: 95°C por 3 minutos (1 ciclo)
 92 °C por 30 segundos
 Hibridación: 52 °C por 30 segundos } 30 ciclos
 72 °C por 1 minuto
 Extensión: 72 °C por 3 minutos (1 ciclo)
 Mantener a 4°C hasta su uso

PCR anidado alelo-específico para el codón 581

A. PCR (25 µL reacción)

2.5 µL dNTPs (5 mM)
 2.5 µL buffer de PCR 10X
 1.25 µL MgCl₂ (50 mM)
 0.05 µL Cebador #185 (50 µM)
 0.05 µL Cebador #218 (50 µM)
 0.12 µL Cebador #201 (50 µM)
 0.12 µL Cebador #261 (50 µM)
 0.06 µL *Taq*ADN Polimerasa (5U/ µL)
 13.35 µL Agua destilada para PCR
 (libre de ADNasa, ARNasa)
 Añadir 5µL de producto del 1^{er} PCR

B. Condiciones de amplificación

Denaturación: 95°C por 3 minutos (1 ciclo)
 92 °C por 30 segundos
 Hibridación: 52 °C por 30 segundos } 30 ciclos
 72 °C por 1 minuto
 Extensión: 72 °C por 3 minutos (1 ciclo)
 Mantener a 4°C hasta su uso

PCR anidado alelo-específico para el codón 613 (A613S / A613T)

A. PCR (25 µL reacción)

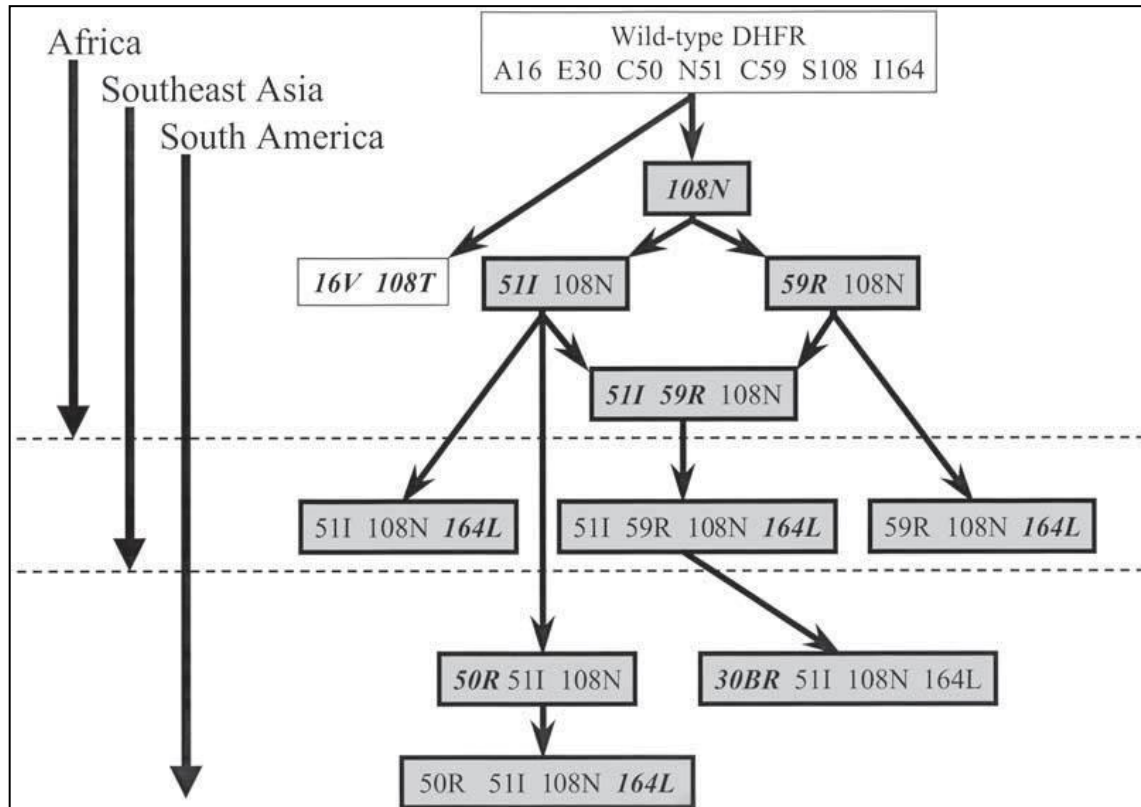
2.5 µL dNTPs (5 mM)
 2.5 µL buffer de PCR 10X
 1.25 µL MgCl₂ (50 mM)
 0.05 µL Cebador #185 (50 µM)
 0.05 µL Cebador #218 (50 µM)
 0.12 µL Cebador #233 (50 µM)
 0.12 µL Cebador #226/251 (50 µM)
 0.06 µL *Taq*ADN Polimerasa (5U/ µL)
 13.35 µL Agua destilada para PCR
 (libre de ADNasa, ARNasa)
 Añadir 5µL de producto del 1^{er} PCR

B. Condiciones de amplificación

Denaturación: 95°C por 3 minutos (1 ciclo)
 92 °C por 30 segundos
 Hibridación*: 52 °C por 30 segundos } 30 ciclos
 72 °C por 1 minuto
 Extensión: 72 °C por 3 minutos (1 ciclo)
 Mantener a 4°C hasta su uso

* 49 °C por 30 segundos si se usan los cebadores #233 y #251

Anexo 12. Evolución de las mutaciones en *Pf dhfr* según Plowe



Fuente: Antimalarial chemotherapy – Philip Rosenthal (72). Wild type: Cepa Silvestre.
Southeast Asia: Sudoeste de Asia, South América: América del Sur

Anexo 13. Lista de genotipos de las muestras del estudio de tesis, casos con malaria severa y/o complicada, departamento de Loreto, 1998 (n=60)

Código	<i>Gen Pfdhfr</i>			<i>Gen Pfdhps</i>			
	RB	N51I	S108N	S436A	A437G	K540E	A581G
M01	RB	I	N	S	G	E	G
M02	RB	I	N	S	G	E	G
M05	RB	I	N	S	G	E	G
M06	RB	I	N	S	G	E	G
M07	RB	I	N	S	G	E	G
M08	RB	I	N	S	G	E	G
M09	RB	I	N	S	G	E	G
M10	RB	I	N	S	G	E	G
M11	RB	I	N	S	G	E	G
M12	RB	I	N	S	G	E	G
M13	RB	I	N	S	G	E	G
M16	RB	I	N	S	G	E	G
M17	RB	I	N	S	G	E	G
M18	RB	I	N	S	G	E	G
M19	RB	I	N	S	G	E	G
M21	RB	I	N	S	G	E	G
M23	RB	I	N	S	G	E	G
M25	RB	I	N	S	G	E	G
M26	RB	I	N	A	G	E	G
M27	RB	I	N	S	G	E	G
M28	No	N	N	S	A	K	A
M29	RB	I	N	S	G	E	G
M30	RB	I	N	S	G	E	G
M31	No	N	N	S	A	K	A
M32	RB	I	N	S	G	E	G
M33	RB	I	N	S	A	K	A
M34	No	N	N	S	A	K	A
M35	RB	I	N	S	G	E	G
M36	RB	I	N	S	G	E	G
M37	No	N	N	S	G	E	G
M38	RB	I	N	S	G	E	G
M39	RB	I	N	S	G	E	G
M40	No	N	N	S	A	K	A
M41	RB	I	N	S	G	E	G
M42	RB	I	N	S	G	E	G
M43	RB	I	N	S	G	E	G
M44	RB	I	N	S	G	E	G
M45	No	N	N	S	A	K	A

	<i>Gen Pfdhfr</i>			<i>Gen Pfdhps</i>			
Código	RB	N51I	S108N	S436A	A437G	K540E	A581G
M46	RB	I	N	S	G	E	G
M47	RB	I	N	S	G	E	G
M48	RB	I	N	S	G	E	G
M49	RB	I	N	S	G	E	G
M50	RB	I	N	S	G	E	G
M51	RB	I	N	S	G	E	G
M52	RB	I	N	S	G	K	G
M53	RB	I	N	S	G	E	G
M54	No	N	N	S	A	K	A
M55	No	N	N	S	A	K	A
M56	RB	I	N	S	G	E	G
M57	RB	I	N	S	G	E	G
M58	RB	I	N	S	G	E	G
M59	RB	I	N	S	G	E	G
M60	RB	I	N	S	G	E	G
M61	RB	I	N	S	G	E	G
M62	RB	I	N	S	G	E	G
M63	No	N	N	S	A	K	A
M64	RB	I	N	S	G	E	G
M65	RB	I	N	S	G	E	G
M66	No	N	N	S	A	K	A
M67	RB	I	N	S	G	K	G